



Alexandra Isabel Frazão Alves

Licenciada em Ciências de Engenharia Biomédica

Membranas de Polímeros Condutores para a Regeneração da Espinal Medula

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Biomédica

Orientador: Célia Maria Reis Henriques, Professora Auxiliar, FCT-UNL

Co-orientador: Jorge Alexandre Monteiro Carvalho Silva, Professor Auxiliar,
FCT-UNL

Júri:

Presidente: Professora Doutora Carla Maria Quintão Pereira

Arguente: Professor Doutor José Luís Constantino Ferreira

Vogal: Professora Doutora Célia Maria Reis Henriques



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Novembro, 2017

Membranas de Polímeros Condutores para a Regeneração da Espinal Medula

Copyright © Alexandra Isabel Frazão Alves, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

If you can't explain it simply, you don't understand it well enough.

Albert Einstein (1879-1955)

Agradecimentos

Este trabalho apresenta-se como o culminar de um caminho de altos e baixos. Nesta página, tanto quanto a minha capacidade me permitir, quero enumerar e agradecer às pessoas que possibilitaram a elaboração desta dissertação e conclusão do meu percurso académico.

À Professora Célia Henriques, minha orientadora, que procurou dar-me todas as ferramentas para seguir o curso que este trabalho ia ditando ao longo destes meses. Agradeço-lhe a oportunidade de ter podido trabalhar consigo, por todo o tempo que comigo dispensou, pela sua boa disposição e por tudo o que ensinou, de forma sempre crítica e concreta, que se mostrou fulcral para a elaboração desta dissertação.

Agradeço ao Professor Jorge Silva, do GREAT, pelos conselhos e sugestões dados no decorrer do trabalho, pela simpatia e predisposição a ajudar.

À minha única colega de laboratório, Joana Vasconcelos, que tanto me ensinou dentro e fora do laboratório. A verdadeira personificação da expressão: “Os amigos não se fazem, reconhecem-se”.

Agradeço à Doutora Ana Baptista e à Professora Isabel Ferreira pela integração no DCM, críticas construtivas e sugestões relevantes à caracterização dos materiais.

Ao Mário Rui, pela sua bravura, integridade e abnegação. A ele estarei eternamente grata pela pessoa que demonstrou ser e por nunca ter baixo os braços, sobretudo neste último ano. O amor que nos une é apenas a confirmação da sua excelência de caráter.

À Judite, Mário e Carolina, obrigada por me terem deixado entrar na vossa casa e nas vossas vidas. Agradeço a sabedoria, o carinho e o ânimo que de vós senti ao longo deste último ano.

À Terrível, à Carla Pratas, à Bia & Miguel e à Cristiana, não tenho muitos, mas os que tenho são (muito) bons.

Aos meus pais, João e Ana, esta dissertação também é vossa. Amo-vos!

Aos meus avós, António e Isabel, um sentido “Obrigada” por todo o amor. Com destaque para o meu avô, mais que meu pai, meu educador, meu mentor, minha inspiração e força motriz, a ele devo muito do que sou e conseguir alcançar até hoje.

As lesões da espinal medula permanecem uma limitação da Medicina. Vários fatores contribuem para a reduzida capacidade regenerativa do tecido nervoso. Em particular, no sistema nervoso central e em resposta à lesão, estabelece-se um ambiente inibidor ao crescimento celular. Acredita-se que a regeneração das falhas nervosas passe por uma abordagem combinatória que inclua biomateriais, fatores de crescimento e células. Matrizes de suporte ao crescimento celular (*scaffold*), sob a forma de condutas neuronais, produzidas a partir de biomateriais com propriedades condutoras, podem servir como meio para estimular a regeneração.

A reduzida solubilidade da generalidade dos polímeros condutores representa um desafio no seu processamento. A polimerização *in situ* constitui um método de contornar esta limitação, no entanto, o revestimento obtido não possui propriedades físico-químicas adequadas à interação célula-matriz. Assim, este trabalho centrou-se no estudo da polimerização química de um polímero condutor – o poli (3, 4 – etilenodioxitiofeno (PEDOT) –, na presença de um polímero biocompatível – o quitosano (CS). A síntese de PEDOT, a partir da oxidação de monómeros de 3,4 – etilenodioxitiofeno (EDOT), para obtenção do híbrido CS/PEDOT, foi otimizada, testando dois oxidantes, o persulfato de amônia (APS) e o cloreto de ferro ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), em diferentes solventes. A resistência do PEDOT foi medida com recurso ao método de duas pontas, de onde se calculou a condutividade do material para filmes e fibras. Concluiu-se a caracterização com a observação da morfologia das estruturas e com a análise da composição química por FTIR.

A partir de uma solução ácida de CS/PEDOT, obtiveram-se matrizes de nanofibras e filmes condutores, passíveis de ser testados *in vitro*, com células neuronais. A sua significativa condutividade, mostrou-se um fator interessante para a estimulação elétrica das células através de *scaffolds* deste material, com eventual impacto na sua proliferação e extensão de neurites.

O cloreto de ferro (III) hexahidratado 50% (v/v) em etanol demonstrou ser um melhor oxidante que o persulfato de amônia por permitir produzir fibras com maior condutividade (independentemente da estrutura) e reduzida citotoxicidade, tal como foi apurado em teste realizado *in vitro* com células Vero.

Palavras-chave: Quitosano; PEDOT; Polimerização; Cloreto de Ferro; Persulfato de Amônia; Eletrofiação; Condutividade; Citotoxicidade.

Spinal cord injuries remain a limitation of medicine. Several factors contribute to the reduced regenerative capacity of nerve tissue. In particular, in the central nervous system and in response to injury, an inhibitory environment that is established for cell growth. It is believed that regeneration of nerve failure undergoes a combinatorial approach that includes biomaterials, growth factors and cells. Scaffolds, in the form of nerve guidance conduits, produced from biomaterials with conductive properties, may serve as a means to stimulate regeneration.

The reduced solubility of most of the conductive polymers presents a challenge in their processing. *In situ* polymerization is a method of circumventing this limitation, however, the coating obtained does not have the adequate physico-chemical properties for cell-matrix interaction. Thus, this work focused on the study of the chemical polymerization of a conductive polymer – poly (3, 4 - ethylenedioxythiophene (PEDOT) – in the presence of a biocompatible polymer – chitosan (CS). The synthesis of PEDOT, from the oxidation of the 3,4 – ethylenedioxythiophene (EDOT) monomer, to obtain the CS/ PEDOT hybrid, was optimized by testing two oxidants, ammonium persulfate (APS) and iron chloride ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), in different solvents. The resistance of PEDOT was measured using the two-point method, from which the conductivity of the film and fiber material was calculated. The characterization was concluded with the observation of the morphology of the structures and the analysis of the chemical composition by FTIR.

From an acid solution of CS/ PEDOT, nanofiber matrixes and conductive films were obtained, capable of being tested *in vitro*, with neural cells. Its significant conductivity proved to be an interesting factor for the electrical stimulation of cells through scaffolds of this material, with an eventual impact on culture and observation regarding its cellular proliferation and neurite extension.

Iron (III) chloride hexahydrate 50% (v/v) in ethanol has been shown to be than ammonium persulfate because it allows to produce fibers with higher conductivity (regardless of structure), smaller diameter fibers and reduced cytotoxicity such as was determined in an *in vitro* test with Vero cells.

Keywords: Chitosan; PEDOT; Polymerization, Iron Chloride; Ethanol; Ammonium Persulfate; Electrospinning; Conductivity; Cytotoxicity.

Índice

ÍNDICE	XIII
LISTA DE FIGURAS	XV
LISTA DE TABELAS	XIX
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	XXI
ENQUADRAMENTO E APRESENTAÇÃO DO TRABALHO.....	1
1 INTRODUÇÃO	7
1.1 ANATOMOFISIOLOGIA DA ESPINAL MEDULA	7
1.2 COMPOSIÇÃO CITOLÓGICA DA ESPINAL MEDULA.....	9
1.3 LESÃO NA ESPINAL MEDULA – RESPOSTA E LIMITAÇÕES À SUA REGENERAÇÃO.....	13
1.4 TERAPÊUTICAS PARA LESÕES NA ESPINAL MEDULA.....	14
1.5 SCAFFOLDS DE POLÍMEROS CONDUTORES	17
1.6 PROCESSO DE CONDUÇÃO	21
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
2.1 MATERIAIS.....	27
2.1.1 Quitosano	28
2.1.2 EDOT/PEDOT	30
2.1.3 Cloreto de ferro (III).....	33
2.1.4 Persulfato de amônia (APS)	34
2.2 MÉTODOS – ELETROFIAÇÃO	35
2.2.1 Montagem experimental do sistema de eletrofiação.....	39
2.2.2 Soluções para eletrofiação.....	40
2.2.3 Produção de filmes e matrizes de fibras	46
2.3 MEDIÇÃO DA CONDUTIVIDADE.....	48
2.4 AVALIAÇÃO DA CONDUTIVIDADE DOS FILMES DE CS/PEDOT	49
2.5 MEDIÇÃO DA CONDUTIVIDADE DAS FIBRAS DE CS/PEDOT	51
2.6 ANÁLISE QUÍMICA DA SOLUÇÃO DE PEDOT	52

2.7	ANÁLISE QUÍMICA DOS FILMES – FTIR.....	54
2.8	CULTURA CELULAR.....	54
2.8.1	<i>Avaliação da viabilidade celular.....</i>	56
3	APRESENTAÇÃO, ANÁLISE E DISCUSSÃO DE RESULTADOS	59
3.1	PRODUÇÃO E ANÁLISE MORFOLÓGICA DAS MATRIZES DE CS/PEDOT	59
3.2	ANÁLISE DA CONDUTIVIDADE DOS FILMES	66
3.3	ANÁLISE DA CONDUTIVIDADE DAS NANOFIBRAS	74
3.4	DIÂMETRO MÉDIO DAS NANOFIBRAS DE CS/ PEDOT	76
3.5	ANÁLISE DOS RESULTADOS DE UV-VIS	78
3.6	ANÁLISE DOS RESULTADOS DE FTIR	82
3.7	TESTE DE CITOTOXICIDADE	88
4	CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS	93
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95
	APÊNDICE.....	103

Lista de Figuras

FIGURA 1.1 - ILUSTRAÇÃO E LEGENDAGEM DA SECÇÃO DA ESPINAL MEDULA (ADAPTADO [14]).....	8
FIGURA 1.2 – DIAGRAMA DA CONSTITUIÇÃO DE UM NEURÔNIO COMUM (ADAPTADO [19]).	11
FIGURA 1.3 – CÉLULA NERVOSA DO SNC (ADAPTADO[19]).....	12
FIGURA 1.4 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE UMA LESÃO NA ESPINAL MEDULA (ADAPTADO [20]).	14
FIGURA 1.5 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS POTENCIAIS FONTES DE CÉLULAS ESTAMINAIS/ PROGENITORAS PARA TRANSPLANTAÇÃO NA ESPINAL MEDULA DANIFICADA (ADAPTADO [27]).	16
FIGURA 1.6 - MORFOLOGIA DAS FIBRAS ALINHADAS DE PEDOT/PLGA E DE CÉLULAS DRG (<i>DORSAL ROOT GANGLIA</i>) APÓS CULTURA NESSAS MATRIZES. A) IMAGEM CONFOCAL DAS NEURITES DOS DRG APÓS MARCAÇÃO COM β -TUBULINA, QUE INDICA QUE AS NEURITES TENDEM A SEGUIR O ALINHAMENTO DAS FIBRAS. B) MARCAÇÃO NUCLEAR COM DAPI (AZUL) E PROTEÍNA S100 (VERMELHO) QUE PERMITE A CO-LOCALIZAÇÃO DAS CÉLULAS DE SCHWANN [42].	21
FIGURA 1.7 - PREENCHIMENTO DOS ESTADOS ELETRÔNICOS EM EQUILÍBRIO TERMODINÂMICO. TRATA-SE DE UM GRÁFICO ENERGIA VS. DENSIDADE DE ESTADOS PARA CADA ENERGIA (ADAPTADO DE WIKIMEDIA COMMONS). NESTA IMAGEM, É POSSÍVEL ACOMPANHAR A GRADAÇÃO DE TONS DE CINZA QUE SEGUIR A DISTRIBUIÇÃO DE FERMI-DIRAC, SENDO QUE A PRETO TODOS OS ESTADOS SE ENCONTRAM OCUPADOS E A BRANCO NENHUM ESTADO ESTÁ OCUPADO.	22
FIGURA 1.8 – ESTRUTURA QUÍMICA DO POLIACETILENO, ONDE É POSSÍVEL OBSERVAR AS LIGAÇÕES DUPLAS CONJUGADAS. A CARACTERÍSTICA ELETRÔNICA COMUM A TODOS OS POLÍMEROS CONJUGADOS PUROS É A PRESENÇA DE LIGAÇÕES SIMPLES E DUPLAS CONJUGADAS AO LONGO DA CADEIA POLIMÉRICA (ADAPTADO [44]).	23
FIGURA 1.9 - DISTORÇÃO DE PEIERL. QUANDO DOIS IÕES SE APROXIMAM, A ENERGIA ASSOCIADA AO AUMENTO DA DISTÂNCIA DA LIGAÇÃO ENTRE OS PARES DE IÕES É SUPLANTADA PELO GANHO ENERGÉTICO ASSOCIADO À FORMAÇÃO DE UMA LIGAÇÃO MAIS PRÓXIMA (ADAPTADO DE WIKIMEDIA COMMONS).....	24
FIGURA 2.1 - ESTRUTURA QUÍMICA DO QUITOSANO (ADAPTADO [54]). DO LADO ESQUERDO ENCONTRA-SE A UNIDADE D-GLUCOSAMINA, QUE SE ENCONTRA DESACETILADA (DD) E DO LADO DIREITO A N-ACETIL-D-GLUCOSAMINA, QUE SE ENCONTRA ACETILADA (1-DD).	29
FIGURA 2.2 - POLIMERIZAÇÃO DE EDOT (ESQUERDA) EM PEDOT (DIREITA) POR OXIDAÇÃO COM FeCl_3 (ADAPTADO [67]).....	33
FIGURA 2.3 – REAÇÃO DE POLIMERIZAÇÃO E DOPAGEM DO PEDOT (ADAPTADO [13]).	33
FIGURA 2.4 – ESTRUTURA QUÍMICA DO CLORETO DE FERRO (III) HEXAHIDRATADO (ADAPTADO DE WIKIMEDIA COMMONS).	34
FIGURA 2.5 – ESTRUTURA QUÍMICA DO PERSULFATO DE AMÔNIA (ADAPTADO DE WIKIMEDIA COMMONS).	34
FIGURA 2.6 - IMAGEM ESQUEMÁTICA DA MONTAGEM DO PROCESSO DE ELETROFIAÇÃO (ADAPTADO[68]).	36

FIGURA 2.7 - MONTAGEM HORIZONTAL DO SISTEMA DE ELETROFIAÇÃO NO COLETOR CILÍNDRICO (VISTAS DISTINTAS DO SISTEMA).....	39
FIGURA 2.8 – EXEMPLO DA SOLUÇÃO OBTIDA POR OXIDAÇÃO COM FeCl_3 EM ETANOL, APÓS POLIMERIZAÇÃO DO EDOT EM PEDOT, CONJUNTAMENTE COM CS 3,6%.	43
FIGURA 2.9 – EXEMPLO DO PRECIPITADO DE CS/ PEDOT OBTIDA POR OXIDAÇÃO DO EDOT COM APS, DEPOIS DE SECO.	44
FIGURA 2.10 - EXEMPLO DA SOLUÇÃO OBTIDA APÓS A REDISSOLUÇÃO DO HÍBRIDO DE CS/ PEDOT SINTETIZADO POR OXIDAÇÃO COM FeCl_3 EM ETANOL.	45
FIGURA 2.11 - EXEMPLIFICAÇÃO DAS LIGAÇÕES DE HIDROGÊNIO ENTRE AS MOLÉCULAS DE QUITOSANO E PEO (ADAPTADO[74]).....	45
FIGURA 2.12 - MICROSCÓPIOS ÓTICOS UTILIZADOS NA ANÁLISE DA MORFOLOGIA DAS NANOFIBRA. À ESQUERDA VWR VisiSCOPE E À DIREITA NIKON ECLIPSE LV100 (ADAPTADO [79]).....	47
FIGURA 2.13 - FILMES DE QUITOSANO E PEDOT NO EXSICADOR ACOPLADO À BOMBA DE VÁCUO.....	47
FIGURA 2.14 - - FONTE DE TENSÃO/AMPERÍMETRO KEITHLEY TEKTRONIX 6487.....	48
FIGURA 2.15 - IMAGEM ESQUEMÁTICA DA PORÇÃO DE FILME A TESTAR, EM QUE A RESULTARÁ DA MULTIPLICAÇÃO DA LARGURA DO CROCODILO QUE FORNECE A VOLTAGEM PELA ESPESSURA DO FILME ($A = D \times E$); (ADAPTADO DE WIKIMEDIA COMMONS).	49
FIGURA 2.16 - EXEMPLIFICAÇÃO DA MEDIÇÃO DA CONDUTIVIDADE DO FILME CS/PEDOT (OXIDAÇÃO COM FeCl_3 50% (v/v) EM ETOH) COM FITA DE CARBONO.....	49
FIGURA 2.17 - MONTAGEM EXPERIMENTAL UTILIZADA PARA MEDIÇÃO DA CONDUTIVIDADE DOS FILMES DE CS/ PEDOT, COM RECURSO A UMA MÁSCARA DE PAPEL. A DISTÂNCIA ENTRE OS DOIS CROCODILOS É DE 0,5 CM, MANTENDO-SE CONSTANTE PARA TODAS AS AMOSTRAS.....	50
FIGURA 2.18 - IMAGEM ESQUEMÁTICA DAS DIMENSÕES DA MÁSCARA DE PAPEL (ESQUERDA) E DO FILME DE CS/PEDOT (DIREITA) UTILIZADOS NA MEDIÇÃO DAS CONDUTIVIDADES. OS 0,2 CM CORRESPONDEM À LARGURA DOS CROCODILOS, MANTENDO-SE ASSIM 0,5 CM FIXOS ENTRE ELES.....	51
FIGURA 2.19 - MONTAGEM EXPERIMENTAL UTILIZADA NA MEDIÇÃO DA CONDUTIVIDADE DAS MATRIZES DE NANOFIBRAS DE CS/PEDOT E RESPECTIVA IMAGEM ESQUEMÁTICA COM AS DIMENSÕES ASSOCIADAS.....	52
FIGURA 2.20 - ESPETROFOTÓMETRO SCANSpec UTILIZADO PARA OBSERVAÇÃO DO ESPETRO UV-VIS DOS SOLVENTES ENVOLVIDOS NA REAÇÃO DE POLIMERIZAÇÃO DO EDOT.....	53
FIGURA 2.21 - POLIMERIZAÇÃO DO EDOT COM FeCl_3 PARA CADA CONJUNTO DE SOLVENTES.....	53
FIGURA 2.22 - ESPETROS DE ABSORVÂNCIA DA RESORUFINA E DA RESAZURINA (ADAPTADO [88]).	57
FIGURA 2.23 – CONJUNTO MICROSCÓPIO DE EPIFLUORESCÊNCIA NIKON ECLIPSE Ti-S (À ESQUERDA) E LEITOR DE PLACAS BIOTEK ELx 800 UV (À DIREITA).	57
FIGURA 3.1 - IMAGENS DE MO 100X DE FIBRAS OBTIDAS A PARTIR DE UMA SOLUÇÃO DE CS 1,8% E PEO 0,4% EM ÁCIDO ACÉTICO 90%(v/v) COM VÁRIOS CONJUNTOS DE PARÂMETROS. COMPARATIVAMENTE AOS PARÂMETROS 20 CM, 10 kV E 0,5 ML/H, É POSSÍVEL VERIFICAR A INFLUÊNCIA DAS VARIAÇÕES DA DISTÂNCIA AGULHA-COLETOR, TENSÃO E CAUDAL, NO DIÂMETRO DAS NANOFIBRAS. OS EFEITOS ESTÃO SUMARIADOS NA TABELA 3.1.....	62
FIGURA 3.2 - IMAGENS DE MO 100X DE FIBRAS OBTIDAS A PARTIR DE UMA SOLUÇÃO DE CS 1,8% CS/PEDOT 1,8% E PEO 1,2% EM ÁCIDO ACÉTICO 90% (v/v), COM VÁRIOS CONJUNTOS DE PARÂMETROS. A VARIAÇÃO DE UM SÓ PARÂMETRO ENTRE DUAS SITUAÇÕES PERMITE VERIFICAR A SUA INFLUÊNCIA NO DIÂMETRO DAS NANOFIBRAS DE CS/PEDOT.	64
FIGURA 3.3 - NANOFIBRAS DO PRIMEIRO LOTE, CS/ PEDOT- FeCl_3 (Et): 400x E 1000x (DA ESQUERDA PARA A DIREITA).	65

FIGURA 3.4 – NANOFIBRAS DO SEGUNDO LOTE, CS/ PEDOT-FeCl ₃ (AQ): 400x E 1000x (DA ESQUERDA PARA A DIREITA).	65
FIGURA 3.5 - NANOFIBRAS DO SEGUNDO LOTE, CS/ PEDOT-APS: 100x, 400x E 1000x (DA ESQUERDA PARA A DIREITA).	65
FIGURA 3.6 - NANOFIBRAS DO SEGUNDO LOTE, CS/ PEDOT-FeCl ₃ -APS: 100x, 400x E 1000x (DA ESQUERDA PARA A DIREITA).	66
FIGURA 3.7 - NANOFIBRAS ELETROFIADAS DE CS/PEDOT-FeCl ₃ (ET) À ESQUERDA A AMOSTRA DO PRIMEIRO LOTE E À DIREITA A DO SEGUNDO LOTE.	66
FIGURA 3.8 - GRÁFICO I(V) OBTIDO PARA UM FILME DE CS/PEDOT-FeCl ₃ (ET) DE DIMENSÕES $\ell = 5$ MM, $D = 5$ MM E $E = 0,1531$ MM (10 MM X 10 MM). O DECLIVE DO AJUSTE LINEAR FORNECE 1R E COM ESTE VALOR CALCULA-SE A CONDUTIVIDADE DO MATERIAL (VER SUBCAPÍTULO 2.4).	67
FIGURA 3.9 - GRÁFICO I(V) OBTIDO PARA UM FILME DE CS/PEDOT-FeCl ₃ (ET) DE DIMENSÕES $\ell = 5$ MM, $D = 5$ MM E $E = 0,1531$ MM (10 MM X 10 MM). O DECLIVE DO AJUSTE LINEAR FORNECE 1R E COM ESTE VALOR CALCULA-SE A CONDUTIVIDADE DO MATERIAL (VER SUBCAPÍTULO 2.4).	67
FIGURA 3.10 - GRÁFICO I(V) OBTIDO PARA UM FILME DE CS/PEDOT-FeCl ₃ (ET) DE DIMENSÕES $\ell = 5$ MM, $D = 5$ MM E $E = 0,1531$ MM (5 MM X 9 MM). O DECLIVE DO AJUSTE LINEAR FORNECE 1R E COM ESTE VALOR CALCULA-SE A CONDUTIVIDADE DO MATERIAL (VER SUBCAPÍTULO 2.4).	68
FIGURA 3.11 - GRÁFICO DE DISPERSÃO DA CONDUTIVIDADE EM FUNÇÃO DE CADA CONDIÇÃO DE POLIMERIZAÇÃO PARA O PRIMEIRO LOTE DE FILMES PRODUZIDOS. AS BARRAS DE INCERTEZA CORRESPONDEM AO ERRO DO DESVIO PADRÃO EXPERIMENTAL.	70
FIGURA 3.12 - GRÁFICO DE DISPERSÃO DA CONDUTIVIDADE EM FUNÇÃO DE CADA CONDIÇÃO DE POLIMERIZAÇÃO PARA O SEGUNDO LOTE DE FILMES PRODUZIDOS. AS BARRAS DE INCERTEZA CORRESPONDEM AO ERRO DO DESVIO PADRÃO EXPERIMENTAL.	71
FIGURA 3.13 – IMAGEM DE MICROSCÓPIO ÓTICO DA EVIDÊNCIA DA SEPARAÇÃO DE FASES E FORMAÇÃO DE MICELAS DO EDOT EM ÁGUA (40x).	72
FIGURA 3.14 – O PRIMEIRO LOTE COMPROVA TER MAIOR CONDUTIVIDADE MÉDIA, RELATIVAMENTE AO LOTE QUE LHE SUCEDEU.	73
FIGURA 3.15 – CONDUTIVIDADE MÉDIA DOS DOIS LOTES DE NANOFIBRAS PRODUZIDOS.	75
FIGURA 3.16 - DIÂMETRO MÉDIO DAS NANOFIBRAS PARA AS QUATRO CONDIÇÕES, COM OS PARÂMETROS 20 CM, 18 kV, 0.6 ML/H E 2200 RPM.	76
FIGURA 3.17 - ESPETRO UV-VIS DE FILMES DE PEDOT NO ESTADO OXIDADO E REDUZIDO, COM UM PICO DE ABSORÇÃO PERTO DOS 350 NM (ADAPTADO [60]).	78
FIGURA 3.18 - ABSORÇÃO UV-VIS DE UMA SOLUÇÃO ETANOICA DE PEDOT SINTETIZADO NUMA SOLUÇÃO 0,1 M NaCl, 0,1 M EDOT E 0,1 M FeCl ₃ , OU SEJA, NUMA PROPORÇÃO ESTEQUIOMÉTRICA DE EDOT:FeCl ₃ DE 1:1 (ADAPTADO [87]). É OBSERVÁVEL UM PICO DE ABSORÇÃO NOS 390 NM E UMA LARGA BANDA DE ABSORÇÃO ATÉ 580 NM, REFERENTE À EXISTÊNCIA DE UM POLARÃO RESPONSÁVEL PELA LIGEIRA CONDUTIVIDADE DO MATERIAL. OS PICOS DE EDOT OBSERVAM-SE A 215 NM E 243 NM E PODEM SER OBSERVADOS NO GRÁFICO DO PEDOT.	79
FIGURA 3.19 - MECANISMO DE DOPAGEM DO PEDOT COM APS, EM QUE OS IÕES SULFATO S ₂ O ₄ ²⁻ ATUAM COMO ACEITADORES DE ELETRÕES (ADAPTADO [89]).	80
FIGURA 3.20 - ESPETRO DE ABSORVÂNCIA UV-VIS DOS DIFERENTES MEIOS DE POLIMERIZAÇÃO ESTUDADOS.	82
FIGURA 3.21 - ESPETRO FTIR DE AMOSTRA-CONTROLO DE FILME DE QUITOSANO 4% DISSOLVIDO EM 2% (V/V) DE ÁCIDO ACÉTICO.	83
FIGURA 3.22 - ESPETRO FTIR DE QUITOSANO PRESENTE NA LITERATURA (ADAPTADO [90]).	83

FIGURA 3.23 - NESTA FIGURA É POSSÍVEL OBSERVAR OS ESPETROS DE FTIR DE UM FILME DE QUITOSANO 4% EM 2% (v/v) ÁCIDO ACÉTICO (A), DE PEO 4% EM 2% (v/v) ÁCIDO ACÉTICO (B), A MISTURA DE AMBOS NA PROPORÇÃO 1:1 (C) E DE MICROFIBRAS ELETROFIADAS (D) A PARTIR DA MESMA MISTURA. OS PICOS MARCADOS COM ‘*’ INDICAM A PRESENÇA DE QUITOSANO E OS PICOS MARCADOS A ‘Δ’ INDICAM A PRESENÇA DE PEO (ADAPTADO [91]).	84
FIGURA 3.24 - ESPETROS FTIR COMPARATIVOS DO FILME CONTROLO DE QUITOSANO E DOS QUATRO FILMES DE QUITOSANO E PEDOT, PARA CADA CONDIÇÃO DE POLIMERIZAÇÃO.	ERRO! MARCADOR NÃO DEFINIDO.
FIGURA 3.25 - ESPETROS FTIR DE PEDOT NEUTRO E NÃO-DOPADO, OBTIDO ATRAVÉS DE POLIMERIZAÇÃO COM FeCl_3 (ADAPTADO [13]).	86
FIGURA 3.26 – ESPETRO FTIR DE EDOT (ADAPTADO [13]).	87
FIGURA 3.27 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA VIABILIDADE CELULAR DE CÉLULAS VERO, ENCUBADAS POR 24 H EM EXTRATOS, COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES, OBTIDA ATRAVÉS DO TESTE COLORIMÉTRICO DE RESAZURINA. AS ABSORVÂNCIAS ENCONTRAM-SE NORMALIZADAS À DO CONTROLO DE CÉLULAS (CC).	89
FIGURA 3.28 – CONTROLO POSITIVO DE CÉLULAS EPITELIAIS EM MEIO COM 10% (v/v) DMSO COM AMPLIAÇÃO DE 200x.	90
FIGURA 3.29 – CONTROLO NEGATIVO DE CÉLULAS EPITELIAIS EM MEIO SEM DMSO COM AMPLIAÇÃO DE 200x.	90
FIGURA 3.30 - IMAGEM DE MO DE CÉLULAS EPITELIAIS EM MEIO CONDICIONADO DE PEDOT A 20%, 10% E 5% (v/v), RESPETIVAMENTE, DA ESQUERDA PARA A DIREITA, OBTIDO POR OXIDAÇÃO COM APS, COM AMPLIAÇÃO DE 200x.	ERRO! MARCADOR NÃO DEFINIDO.
FIGURA 3.31 - IMAGEM DE MO DE CÉLULAS EPITELIAIS EM MEIO CONDICIONADO DE PEDOT A 20%, 10% E 5% (v/v), RESPETIVAMENTE, DA ESQUERDA PARA A DIREITA, OBTIDO POR OXIDAÇÃO COM FeCl_3 EM H_2O , COM AMPLIAÇÃO DE 200x.	ERRO! MARCADOR NÃO DEFINIDO.
FIGURA 3.32 - IMAGEM DE MO DE CÉLULAS EPITELIAIS EM MEIO CONDICIONADO DE PEDOT A 20%, 10% E 5% (v/v), RESPETIVAMENTE, DA ESQUERDA PARA A DIREITA, OBTIDO POR OXIDAÇÃO COM FeCl_3 EM ETOH, COM AMPLIAÇÃO DE 200x.	ERRO! MARCADOR NÃO DEFINIDO.

Lista de Tabelas

TABELA 2.1 - PROPRIEDADES FÍSICAS DO MONÓMERO EDOT (ADAPTADA [13]).....	30
TABELA 2.2 - POLÍMEROS, SOLVENTES E SAIS UTILIZADOS NA SÍNTESE DAS SOLUÇÕES POLIMÉRICAS.	40
TABELA 2.3 - PROPORÇÃO MOLAR EDOT: OXIDANTE UTILIZADA PARA CADA SOLUÇÃO. A MÉDIA DAS PROPORÇÕES É DE 3,03:1.....	42
TABELA 3.1 - EFEITOS DOS PARÂMETROS NA MORFOLOGIA DAS FIBRAS.....	60
TABELA 3.2 - TABELA RESUMO DAS ESPESSURAS, DECLIVES E CONDUTIVIDADE DE FILMES QUADRADOS DE 10 MM DE LADO, COM $\ell = 5\text{ mm}$ E $d = 5\text{ mm}$, CUJOS VALORES ASSOCIADOS A CADA CONDIÇÃO DE PRODUÇÃO, SE REFEREM AOS VALORES DO PRIMEIRO LOTE E AOS DO SEGUNDO, EM SEGUIDA.....	68
TABELA 3.3 - TABELA RESUMO DAS ESPESSURAS, DECLIVES E CONDUTIVIDADE DE FILMES RETANGULARES DE 5 MM DE LARGURA E 9 MM DE COMPRIMENTO, COM $\ell = 5\text{ mm}$ E $d = 5\text{ mm}$, CUJOS VALORES ASSOCIADOS A CADA CONDIÇÃO DE PRODUÇÃO, SE REFEREM AOS VALORES DO PRIMEIRO LOTE E AOS DO SEGUNDO, EM SEGUIDA. ..	69
TABELA 3.4 - TABELA DE CONDUTIVIDADE REFERENTE AOS FILMES DO PRIMEIRO LOTE.	70
TABELA 3.5 - TABELA DE CONDUTIVIDADE REFERENTE AOS FILMES DO SEGUNDO LOTE.....	71
TABELA 3.6 - TABELA RESUMO DAS ESPESSURAS, DECLIVES E CONDUTIVIDADE DE MATRIZES DE NANOFIBRAS, COM $\ell = 5\text{ mm}$ E $d = 5\text{ mm}$, CUJOS VALORES ASSOCIADOS A CADA CONDIÇÃO DE PRODUÇÃO, SE REFEREM AOS VALORES DO PRIMEIRO LOTE E AOS DO SEGUNDO, EM SEGUIDA.	74
TABELA 3.7 - VALORES ASSOCIADOS À FIGURA 3.15, CONDUTIVIDADE MÉDIA DOS DOIS LOTES DE NANOFIBRAS.	75
TABELA 3.8 - VALORES ASSOCIADOS À FIGURA 3.16, DIÂMETRO MÉDIO DOS DOIS LOTES DE NANOFIBRAS.....	76
TABELA 3.9 - ATRIBUIÇÃO DO SIGNIFICADO DOS PICOS DE ABSORVÂNCIA OBSERVADOS NA FIGURA 3.18, EM PARALELO COM O ESTIPULADO NA LITERATURA (ADAPTADO[86]).	84

Lista de Siglas e Abreviaturas

AcAc – Ácido acético

APS – Persulfato de amônia

ATP – Adenosina trifosfato

ATR- FTIR – Attenuated Total Reflectance Fourier Transform Infrared Spectroscopy

BDNF – Brain-Derived Neurotrophic Factor

CS – Quitosano

DD – Deacetylation Degree

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium

EDOT – 3,4 - etilenodioxítiofeno

ESCs – Embrionary Stem Cells

ETOH – Etanol

FBS – Fetal Bovine Serum

FeCl₃ – Cloreto de ferro (III) anidro

FeCl₃.6H₂O – Cloreto de ferro (III) hexahidratado

GDNF – Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor

H₂O – Água

HCl – Ácido clorídrico

IGF-1 – Insulin-like Growth Factor-1

iPSCs – Induced Pluripotent Stem Cells

MAPS – Microtubule-Associated Proteins

MEC – Matriz extracelular

MO – Microscopia ótica
MSCs – Mesenchymal Stem Cells)
MW – Molecular Weight
NaOH – Hidróxido de sódio
NFH – Neurofilament Heavy
NFL – Neurofilament Light
NFM – Neurofilament Medium
NSCs – Neural Stem Cells
OECs – Olfactory Ensheathing Cells
PANi – Polianilina
PCL – Poli(caprolactona)
PEDOT – Poli (3,4 – etilenodioxitiofeno)
PEDOT: PSS – Poli (3,4 – etilenodioxitiofeno): Poli (estirenosulfonato)
PEO – Poli (óxido de etileno)
PLGA – Ácido poliglicólico
PPy – Polipirrole
PSS – Poli (estirenosulfonato)
SCs – Schwann Cells
SNC – Sistema Nervoso Central
SNP – Sistema Nervoso Periférico
VPP – Vapor Phase Polymerization

Enquadramento e Apresentação do Trabalho

O Sistema Nervoso Central (SNC) é o nome atribuído à intrincada rede formada pelo cérebro e espinal medula. Esta última é responsável pela condução e integração de sinais motores e sensoriais, permitindo a estimulação quer reflexa, quer consciente, do Sistema Nervoso Periférico (SNP).

A espinal medula é uma estrutura tubular e alongada, constituída por tecido nervoso e responsável pela transmissão de informação entre o encéfalo e o resto do corpo. Corresponde à porção do SNC que ocupa o canal vertebral por onde existe a condução do estímulo nervoso. Este canal, para além de responsável pela comunicação entre centros encefálicos e o SNP, é também responsável pela coordenação nervosa da atividade reflexa e quotidiana.

As lesões medulares permanecem sem cura efetiva. As abordagens terapêuticas atuais combinam a medicação anti-inflamatória (metilprednisolona) e a intervenção cirúrgica para descompressão e estabilização da espinal medula e a reabilitação, com vista à recuperação da função motora [1].

A regeneração da espinal medula é um processo muito complexo. Enquanto que o SNP se encontra dotado de neuro-regeneração, através de um ambiente bioquímico adequado, o SNC é incapaz de o fazer.

A regeneração de lesões do SNP de maior extensão, ainda que de menor impacto, passa pela formação de extensões de fibrina ao longo da falha nervosa. Isto permite a migração de células de Schwann que darão a estabilidade e orientação necessárias à promoção da extensão de neurites [2]. No caso do SNC, a regeneração não é possível devido ao próprio ambiente inibitório que se forma em resposta à lesão e que contribui para a sua progressão. De facto, quando um axónio é danificado, o segmento distal sofre degeneração Walleriana, conduzindo à sua desmielinização, e o segmento proximal acaba por sofrer apoptose.

Resumidamente, no SNC a lesão primária origina uma cascata de mecanismos de *feedback* positivo, inibindo a regeneração axonal – lesão secundária.

A rutura de vasos e a morte celular conduzem a uma resposta inflamatória por parte dos macrófagos, neutrófilos e leucócitos, responsáveis pela fagocitose de detritos celulares. Esta ação imunitária caracteriza-se pela formação de uma cavidade cística envolvida por uma cicatriz glial e pela acumulação de inibidores como os proteoglicanos de sulfato de condroitina, impossibilitando a regeneração e remielinização axoniais, o que impede o restabelecimento da comunicação nervosa entre as duas extremidades da lesão. Ainda que o principal objetivo deste potencial inibidor seja o de estabilizar e proteger a espinal medula danificada, ele acaba por originar uma lesão crónica [3]. A medicação com metilprednisolona, um fármaco anti-inflamatório, nas horas que se seguem à ocorrência de uma lesão traumática ou no pós operatório, visa o controlo da lesão secundária [1].

O restabelecimento da função neuronal, poderá passar pelo ligação das extremidades da área lesada [4]. Assim, a engenharia de tecidos propõe uma abordagem em que a reparação do tecido é assistida por uma estrutura tridimensional para suporte celular (*scaffold*) que possa estimular a regeneração dos axónios, bem como a adesão, proliferação e migração de células, transplantadas ou nativas. As propriedades físico-químicas de um *scaffold* determinam o seu desempenho, sendo que a biocompatibilidade, a biodegradabilidade, as propriedades mecânicas e a funcionalidade são aspetos importantes a ter em conta. A funcionalidade de um *scaffold* depende da sua estrutura. A porosidade e a interconectividade porosa, têm de permitir a infiltração celular, a vascularização e estimular o crescimento orientado de neurites – orientação de contacto.

A característica de maior relevo que distingue um biomaterial de um qualquer outro tipo de material é a sua capacidade de coexistir no corpo de um hospedeiro, em contacto com os seus tecidos, sem o risco de resposta imunitária exagerada. Quando usado para a produção de um *scaffold*, é igualmente importante que a sua taxa de degradação acompanhe a taxa de regeneração do tecido. O *scaffold* também deve suportar esterilização e possuir propriedades mecânicas que permitam a sua boa integração nos tecidos circundantes e robustez de forma a resistir ao colapso tanto durante a implantação como já na fase de regeneração do paciente [5].

Na literatura corrente, encontram-se estudos com *scaffolds* baseados em hidrogéis, esponjas porosas, e estruturas fibrosas. Os hidrogéis são dispositivos capazes de mimetizar as propriedades mecânicas do tecido nervoso do SNC,

podendo integrar moléculas da matriz extracelular (MEC) e proteínas adesivas [3]. No entanto são relativamente frágeis e não proporcionam orientação de contacto. Conduitas neurais produzidas a partir de nanofibras apresentam grande porosidade e elevada razão área/volume, o que estabelece um ambiente propício ao desenvolvimento celular. [6]. A utilização de nanofibras alinhadas permite introduzir orientação de contacto na estrutura. Consequentemente, os hidrogéis mostram-se apropriados para lesões mais reduzidas, ao passo que *scaffolds* de nanofibras se mostram mais adequados para falhas maiores [4].

Alguns polímeros, naturais e sintéticos, podem ser combinados para produzir *scaffolds* biocompatíveis e biodegradáveis que ofereçam um ambiente propício à substituição temporária de um tecido tendo em conta as suas características específicas. Assim, neste trabalho, será avaliada uma forma de combinar um biopolímero natural, o quitosano (CS), com um polímero altamente condutor, o poli (3,4-etilenodioxitiofeno) (PEDOT), para produzir um híbrido CS/PEDOT, com propriedades condutoras adequadas à produção de *scaffolds* de nanofibras destinados à regeneração neuronal.

As propriedades elétricas das células, como a capacidade de manter e ajustar a diferença de potencial entre os meios extra e intracelulares, conduziram ao estudo da influência da estimulação elétrica de neurónios na regeneração nervosa. Na literatura, são várias as demonstrações de que a estimulação elétrica de baixa frequência acelera a regeneração e reinervação nervosas mesmo que a intervenção não seja imediata e a estimulação seja de curta duração [7][8][9][10]. A utilização de *scaffolds* condutores de polipirrole e quitosano também demonstrou bons resultados na união das extremidades de uma falha no nervo ciático de rato, de cerca de 15 mm, melhorando a regeneração nervosa e a recuperação da função motora através da remielinização dos axónios regenerados [11].

Para além da insolubilidade, comum à grande maioria dos polímeros condutores, a escolha do PEDOT para este trabalho reside nas limitações associadas aos outros dois polímeros, atualmente mais estudados: a polianilina (PANi) e o polipirrole (PPy). Apesar de ambos atingirem valores de resistividade reduzidos, cerca de 4 k Ω .m, apresentam certos obstáculos à sua utilização em engenharia de tecidos. A PANi não só revela baixa estabilidade à oxidação, como evidencia reduzida adesão e proliferação celulares. Já o PPy demonstra dificuldades associadas com o seu processamento em estruturas tridimensionais complexas, bem como reduzida biodegradabilidade. Estas características impelem a procura de um novo polímero, mais estável, de mais fácil processamento e maior biocompatibilidade, como o PEDOT.

Este projeto teve como objetivo a produção de *scaffolds* condutores de CS e PEDOT. Para tal, o PEDOT foi polimerizado e produzido um híbrido CS/PEDOT. Foi analisado o processo de eletrofiação de soluções contendo CS/PEDOT e obtiveram-se, a partir delas, matrizes de nanofibras e filmes. Os materiais foram avaliados quanto à sua condutividade, composição química e citotoxicidade.

A primeira tarefa consistiu na reação de polimerização química do EDOT, com recurso a dois oxidantes. Para tal o oxidante foi adicionado a soluções de quitosano, EDOT e ácido acético, obtendo-se o dito híbrido de CS/PEDOT sob a forma de precipitado sólido – a *pellet*. Os precipitados obtidos foram redissolvidos em soluções ácidas de quitosano, obtendo-se as soluções finais de CS/PEDOT de onde foram produzidas matrizes de nanofibras, após ajuste de alguns parâmetros. As mesmas soluções foram usadas para a produção de filmes. Foi depois efetuada a medição da condutividade das matrizes de nanofibras e dos filmes.

Para a produção de matrizes de nanofibras recorreu-se à técnica de eletrofiação. Esta técnica permite produzir matrizes de fibras micro ou submicro-métricas (nanofibras) a partir de soluções poliméricas. Quando recolhidas numa superfície estática, são obtidas estruturas de fibras com uma elevada proporção área/volume e grande porosidade, assemelhando-se à porosidade e geometria fibrosa da membrana basal dos tecidos. Quando depositadas numa superfície cilíndrica rotatória é possível induzir um grau de alinhamento que é favorável à regeneração guiada dos axónios. Além disso, a possibilidade de criação de superfícies tridimensionais química e fisicamente estáveis através da eletrofiação, fazem desta abordagem uma das mais promissoras na Engenharia de Tecidos. Os parâmetros de eletrofiação utilizados partiram de parâmetros já testados no GREAT com soluções de quitosano a 1,8% em ácido acético a 90% (v/v) e PEO 0,4%, no entanto, devido à especificidade das soluções de CS/PEDOT, tanto os parâmetros de eletrofiação como os de soluções tiveram de ser ajustados e otimizados.

Foi feita também uma cultura celular com uma linha de células epiteliais, às quais foram adicionados meios condicionado pelos híbridos de CS/PEDOT (extratos). Para avaliação da citotoxicidade dos extratos recorreu-se à rezasurina, como indicador da viabilidade das células quando em contacto com o CS/PEDOT. Infere-se destes testes se o passo de lavagem foi suficiente para a eliminação de oxidante e/ou monómero não reagidos. Testaram-se os precipitados sólidos de PEDOT sintetizados com cloreto de ferro e persulfato de amónia, de onde se concluiu que todos os sólidos de CS/ PEDOT testados com o

precipitado sólido de CS/ PEDOT estavam livres de agentes citotóxicos, pois todas as amostras apresentavam elevada viabilidade.

A longo-prazo, seria interessante testar *in vitro* a adesão, proliferação e morfologia de células neuronais semeadas nos filmes e nas matrizes de nanofibras, não sujeitas e sujeitas a estimulação elétrica através do substrato. A produção de condutas neuronais com PEDOT possibilitaria munir a conduta da condutividade necessária à aplicação de estimulação elétrica, o que poderá contribuir para a recuperação da função motora perdida. Futuramente, condutas neuronais com menor impedância possibilitariam uma estimulação mais eficiente das células cultivadas nas estruturas 3D produzidas.

Esta dissertação está organizada, para além deste enquadramento geral e definição das principais metas trabalho, em quatro outros capítulos.

No capítulo 1 é feita uma introdução ao tema da dissertação – a síntese de um polímero condutor direcionado para a produção de um *scaffold* que permita a estimulação elétrica de células. São identificadas as principais limitações à regeneração da espinal após lesão medular e quais as terapêuticas possíveis na área de Engenharia de Tecidos, Biomateriais e Biologia Molecular. Com destaque para a regeneração guiada de axónios, atuais limitações à produção de condutas neuronais condutoras e de que forma o PEDOT as suplanta.

O capítulo 2 inicia-se pela apresentação dos materiais e metodologias utilizados, tanto ao nível da produção como da caracterização. Depois de apresentados os materiais usados, a estrutura de apresentação das metodologias segue os passos do trabalho: estudo da polimerização do PEDOT com recurso a diferentes oxidantes na presença de CS para obtenção dos híbridos CS/PEDOT, a incorporação de CS/PEDOT em soluções a partir das quais se produzem as matrizes de fibras e os filmes, a sua caracterização morfológica, elétrica e química e finalmente a avaliação *in vitro* da citotoxicidade dos híbridos CS/PEDOT.

Finalmente, no capítulo 4 consolidam-se as conclusões relevantes deste trabalho e apresentam-se as perspetivas para o seu desenvolvimento futuro.

1 Introdução

1.1 Anatomofisiologia da espinal medula

A espinal medula é uma estrutura tubular e alongada, constituída por tecido nervoso, responsável pela transmissão de informação entre o encéfalo e o resto do corpo. Nos seres humanos, a espinal medula tem origem na base do cérebro e estende-se à vértebra L1. As vértebras são partições da coluna vertebral; ossos cuja principal função é a de acomodar a espinal medula e protegê-la de agressões mecânicas. A sobreposição das vértebras permite a passagem do canal pelo forame intervertebral, onde convergem as diferentes fibras nervosas. Dentro do canal vertebral, na sua parte mais exterior (matéria branca) feixes de fibras nervosas, estendem-se longitudinalmente estabelecendo a comunicação com o cérebro. A matéria branca encontra-se envolvida por tecido conjuntivo – as três meninges. Da mais externa, para a mais interna, denominam-se duramáter, aracnoide e pia-máter.

A espinal medula encontra-se organizada em 4 regiões que, em ordem descendente, são: as regiões cervical, torácica, lombar e sacrococcígea. Esta estrutura tubular possui cerca de 40 a 50 cm de comprimento e um diâmetro variável de 10 a 15 mm. Demonstrando, na maioria dos indivíduos, intumescência nas regiões cervical e lombar, que inervam os membros superiores e inferiores, respetivamente.

A comunicação da espinal medula com o SNP é assegurada por feixes de fibras nervosas aferentes e eferentes (ver figura 1.1). Os feixes de fibras nervosas

aferentes (ou posteriores) juntam-se originando as raízes dorsais que recebem informação sensorial do SNP. Em sentido contrário, a informação é transmitida dos neurónios motores da espinal medula em direção ao SNP por feixes eferentes (ou anteriores) que se juntam formando as raízes ventrais. As fibras nervosas das raízes dorsais e ventrais origina juntam-se no nervo espinal. Essa união ocorre num ponto distal ao gânglio espinal da raiz dorsal do nervo. É no gânglio espinal que se encontram os corpos celulares dos neurónios sensoriais, daí se prolongam os axónios desses mesmos neurónios, seguindo até à medula (matéria branca) pela raiz dorsal. A espinal medula pode ser dividida anatomicamente em 31 segmentos, cada um com a sua raiz sensorial e motora. Ou seja, cada um com o seu par de nervos espinhais: 8 pares cervicais, 12 pares torácicos, 5 pares lombares, 5 pares sacrais e 1 coccígeo.

A figura 1.1 apresenta uma ilustração coaxial da secção da espinal medula [12]. Numa secção transversal da medula espinal, distinguem-se de imediato duas porções; uma porção central cinzenta em forma de “H” e uma outra porção branca que a envolve, apelidadas de matéria cinzenta e matéria branca, respetivamente. A primeira é constituída por corpos celulares de neurónios intermédios, dendrites e axónios de neurónios eferentes (motores) células gliais e axónios desmielinizados. A matéria cinzenta encontra-se envolta pela matéria branca que, por sua vez, é composta por axónios mielinizados, tanto motores como sensoriais. Estes constituem os tratos ou fibras de passagem longa que percorrem a espinal medula; de forma descendente para retransmitir informação do cérebro aos músculos e ascendente para transmitir informação dos músculos ao cérebro. Estes tratos também contêm outras células da glia como, por exemplo, os oligodendrócitos. Estas células gliais originam a mielina que reveste os tratos e produzem fatores neurotróficos de crescimento como o GDNF (*Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor*), o BDNF (*Brain-Derived Neurotrophic Factor*) e o IGF-1 (*Insulin-like Growth Factor-1*).

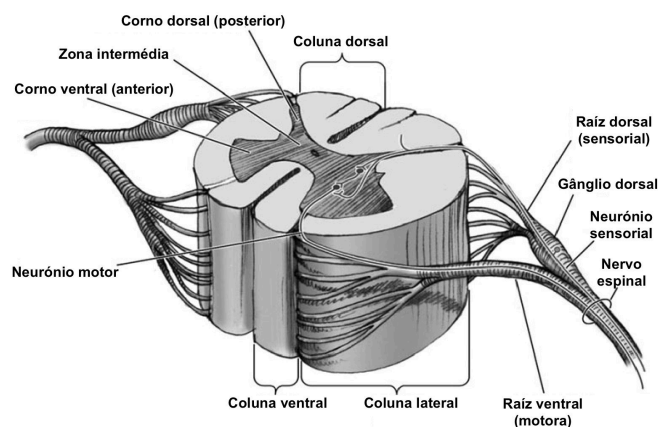


Figura 1.1 - Ilustração e legendagem da secção da espinal medula (adaptado [12]).

1.2 Composição citológica da espinal medula

O neurónio é tido como a unidade básica funcional do Sistema Nervoso. Este, por sua vez, trata-se de uma rede de feixes de fibras nervosas, constituídos por axónios interligados capazes de originar e propagar sinais elétricos e químicos. A transmissão destes sinais ocorre através das sinapses nervosas. Nestas estruturas, estão envolvidos o neurónio pré-sináptico, que transmite o sinal, e o neurónio pós-sináptico, que o recebe. Em muitos casos, a porção pré-sináptica encontra-se no axónio e a porção pós-sináptica localiza-se nas dendrites. Existem sinapses químicas em que os fluxos elétricos se devem à libertação de neurotransmissores para a fenda sináptica e sinapses elétricas, mais rápidas, em que as membranas pré e pós-sinápticas se encontram ligadas, formando uma junção que permite o fluxo direto dos iões. O processo que despoleta a libertação de neurotransmissores e, portanto, o processo de transmissão de informação, é o potencial de ação, ou seja, a despolarização da membrana do axónio.

O neurónio é constituído por um corpo celular, ou soma, e por dois prolongamentos protoplasmáticos que dele nascem; as dendrites e o axónio. O corpo celular pode originar múltiplas dendrites, mas apenas um axónio. É nele que se encontra o núcleo e, portanto, onde se dá a síntese proteica, e onde se localizam também outros organelos como as mitocôndrias, ribossomas ou o aparelho de Golgi.

O citoesqueleto dos neurónios é responsável pela movimentação de material ao longo do axónio, como as vesículas pré-sinápticas, e por conferir ao neurónio a sua estrutura. Este representa uma parte muito importante das relações estruturais e funcionais do neurónio, sobretudo pelas proteínas que o compõem. O citoesqueleto neuronal é composto por três tipos de filamentos proteicos: os microtúbulos, os neurofilamentos e os microfilamentos.

Os microtúbulos são heterodímeros compostos por duas subunidades: α e β -tubulina. Estes dímeros polimerizam longitudinalmente formando cerca de treze protofilamentos que, paralelos entre si, dão origem a uma estrutura cilíndrica oca com cerca de 25 nm de diâmetro externo. As MAPS (*Microtubule-Associated Proteins*) são um grupo de proteínas capazes de interagir com os microtúbulos e assim regular certas funções como a polimerização, despolimerização e transporte de vesículas, que determinam a sua estabilidade estrutural. Os microtúbulos não só disponibilizam um substrato para o transporte de organelos ligados à membrana como são fulcrais para a extensão de neurites durante o processo de desenvolvimento do corpo humano. Mesmo após a extensão, os

microtúbulos asseguram a manutenção estrutural das neurites bem como a manutenção da definição e integridade dos compartimentos intracelulares [13].

Os neurofilamentos fazem parte da família dos filamentos intermédios, estando presentes ao longo de todo o neurónio, particularmente nas neurites. Possuem cerca de 10 nm de diâmetro e a mesma espessura associada à membrana celular. A sua estrutura peptídica alongada pode estender-se por centenas de μm e distinguem-se dos filamentos de células gliais ou não-neuronais pois estes últimos são mais curtos e sem projeções laterais. Estes heteropolímeros são compostos por quatro subunidades que variam de acordo com a origem dos neurofilamentos. Nos neurofilamentos do SNC, existem quatro subunidades de polipéptidos que se subdividem de acordo com o seu peso molecular, nomeadamente *Neurofilament Heavy*, *Medium* e *Light* (NFH, NFM e NFL) e a α -internexina (Int). Enquanto que no SNP, os neurofilamentos são constituídos por polipéptidos NFH, NFM e NFL e periferina. Caracterizados pelas suas propriedades elásticas, os neurofilamentos permitem a manutenção da forma neuronal e do crescimento radial dos axónios. Aliada a estas funções, intervêm também na regulação dos volumes celulares e axoniais [13][14][15].

Os microfilamentos são compostos por monómeros de uma proteína globular altamente contrátil, a actina, que se dispõe longitudinalmente, entrelaçando-se em fibrilas de cerca de 7 nm de diâmetro. São inúmeras as proteínas que interagem com os microfilamentos de actina, o que sugere a presença destes microfilamentos num vasto leque de funções. Podem ser encontrados ao longo dos neurónios e células gliais, sendo os principais constituintes do citoesqueleto. No entanto, existem em maior abundância nos neurónios da região cortical, nomeadamente, perto da membrana plasmática e particularmente nos terminais pré-sinápticos, espículas dendríticas e cones de crescimento. Os microfilamentos do citoesqueleto da membrana neuronal visam manter a distribuição e compartimentalização de proteínas da membrana plasmática, estabelecer a morfologia e estrutura celulares e mediar o contacto entre o neurónio e o meio extracelular. Adicionalmente, são também essenciais à migração celular, à motilidade do cone de crescimento e à mielinização [13][16].

As dendrites são as projeções ramificadas e especializadas do neurónio, com origem no corpo celular, cuja principal função é a de propagação do estímulo eletroquímico. Este, por sua vez, é recebido do terminal axonal do neurónio pré-sináptico, ou das células epiteliais sensoriais, pelas sinapses. São as dendrites que integram estes estímulos e que determinam a extensão dos potenciais de ação de resposta.

O axónio é o outro tipo de prolongamento protoplasmático do corpo celular. É responsável pela condução do impulso eletroquímico até à célula-alvo (seja ela neuronal, muscular ou glandular) e difere das dendrites em forma (raio constante), tamanho (maior comprimento) e função (as dendrites recebem os impulsos e os axónios transmitem-nos). Numa sinapse química, o sinal propaga-se pelo axónio do neurónio até às suas ramificações terminais, os telodendros, onde se encontram as vesículas sinápticas que contêm os neurotransmissores. Quando o impulso nervoso atinge o terminal pré-sináptico, estas fundem-se com a membrana, difundindo os neurotransmissores para a fenda sináptica. Os neurotransmissores ligam-se a recetores específicos localizados na membrana pós-sináptica, que se podem encontrar tanto no soma da célula pós-sináptica como nas suas dendrites. Assim, inicia-se o influxo nervoso na célula pós-sináptica. Na figura 1.2 é possível observar a ilustração da composição dos axónios, com os seus componentes principais, no sentido da condução do impulso [17].

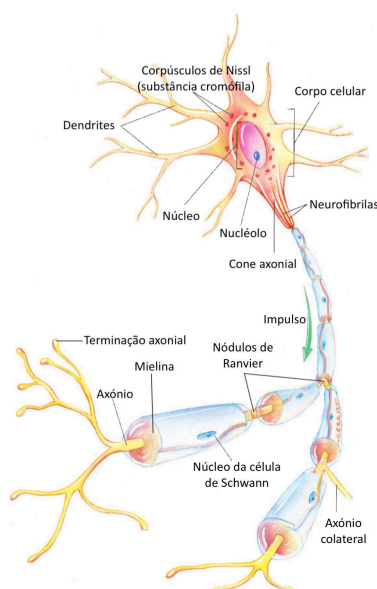


Figura 1.2 – Diagrama da constituição de um neurónio comum (adaptado [17]).

Os neurónios são células excitáveis, capazes de manter diferenças de potencial entre os meios intra e extracelular. A propagação do sinal elétrico dá-se graças à excitabilidade elétrica da membrana neuronal, através da sua despolarização e repolarização. As células nervosas partem de um potencial de repouso, decorrente da diferença de potencial existente entre os meios intra e extracelulares, mantido por bombas iónicas metabólicas capazes de transportar iões de sódio e potássio contra os respetivos gradientes de concentração, à custa de energia (ATP). A despolarização da membrana das células acima de um limiar,

conduz a uma maior entrada de iões de sódio face à saída de iões de potássio, a favor do gradiente, dando-se o potencial de ação. Assim, existe uma componente química – a libertação de neurotransmissores – que é despoletada por uma componente elétrica – o potencial de ação.

No SNC, a maior parte das células constituintes são células gliais, responsáveis pelo suporte, proteção e controlo metabólico do tecido nervoso. Numa primeira abordagem, as células da glia são o suporte físico dos neurónios, mas além disso, controlam a migração neuronal, a extensão de neurites, o crescimento axonal e participam ativamente na transmissão sináptica. Ao contrário dos neurónios, as células gliais sofrem mitose. A proliferação descontrolada das células da glia pode originar neoplasias que eventualmente podem desenvolver tumores.

Existem quatro tipos de neuróglia associados ao SNC: os astrócitos, os endotélio, os oligodendrócitos e os microglíocitos. A figura 1.3 ilustra um exemplo de cada um dos quatro tipos, por posição e função [17].

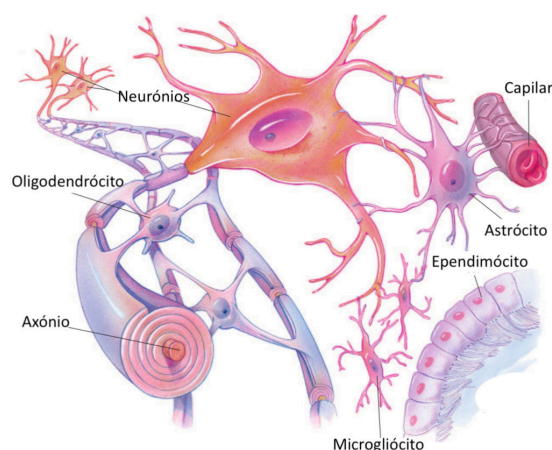


Figura 1.3 – Célula nervosa do SNC (adaptado[17]).

Os astrócitos ou astroglia, são o tipo de macroglia mais abundante e de maiores dimensões no SNC. Possuem várias projeções citoplasmáticas que se conectam, através das suas terminações, à parede dos vasos sanguíneos do SNC, envolvendo-a. Deste modo, é constituída a barreira hemato-espinomedular que medeia o contacto entre o sangue circulante e o fluido extracelular do SNC, filtrando a sua composição. Os astrócitos possibilitam o fornecimento de certos metabolitos, como a glucose e o lactato, por exemplo.

Os endotélio são células cúbicas pertencentes à neuróglia epitelial, que compõem o revestimento interno dos ventrículos cerebrais e do canal cen-

tral da espinal medula. Estão diretamente envolvidos na regulação da produção e secreção do líquido cefalorraquidiano.

Os oligodendrócitos são células pouco ramificadas e de menores dimensões, comparativamente aos astrócitos, cuja principal função é a de mielinização dos axónios, no SNC. No SNP, as células que lhes são equivalentes são as células de Schwann.

Os microgliócitos são células macrofágicas residentes que atuam como principal resposta imunitária do SNC. Têm dimensões muito reduzidas, comparativamente à macroglia, com prolongamentos igualmente curtos.

1.3 Lesão na espinal medula – resposta e limitações à sua regeneração

Ao contrário do que sucede com o SNP, lesões infligidas aos neurónios do SNC geralmente resultam na sua morte e, uma vez que estes não sofrem mitose, também não são substituídos, existindo rutura da ligação neuronal. No SNP, as células de Schwann podem ser mielinizantes ou não mielinizantes, sendo que nas primeiras, a camada citoplasmática nucleada externa que recobre o axónio do neurónio, se denominada neurilema. No SNC, se um axónio é separado do seu corpo celular, a porção distal irá degenerar muito lentamente, no entanto, os oligodendrócitos, desprovidos de neurilema, são incapazes de criar um tubo de membrana basal que guie o crescimento da porção proximal do axónio, daí que a regeneração é impossível. Uma fratura, laceração ou contusão podem originar lesões medulares severas, sendo que a transecção de um nervo é o tipo de lesão medular mais grave. Existem reações pós-traumáticas que incluem a restrição do suprimento de oxigénio e rutura da barreira hemato-espinomedular, com consequente infiltração de células inflamatórias. Isto conduz à formação de edema, isquemia celular e, naturalmente, necrose neuronal. É este conjunto de acontecimentos, a que se dá o nome de lesão primária, que irá desencadear uma cascata de reações secundárias (lesão secundária) que conduzirão a um ambiente inflamatório.

Esse ambiente tem origem no recrutamento de macrófagos, neutrófilos e leucócitos à zona afetada, com o objetivo de fagocitar detritos celulares e prevenir o avanço da lesão. Os astrócitos, também desempenham um papel imunitário importante na cicatrização após o trauma, através de um processo denomi-

nado por astrogliose. Este processo caracteriza-se por alterações na expressão molecular dos astrócitos, que conduzem à sua hipertrofia e proliferação exacerbada (hiperplasia), resultando na formação de uma cicatriz glial, como demonstra a figura 1.4[18]. Em poucos dias, ou semanas até, forma-se, no local de lesão, um quisto de fluido, revestido por cicatriz glial, composto maioritariamente de astrócitos reativos. Estes astrócitos reativos segregam também proteínas inibitórias do crescimento e regeneração axoniais, como os proteoglicanos de sulfato de condroitina. No SNC, a intrusão dos macrófagos no local da lesão também é travada muito por causa da barreira hemato-espinomedular, abrindo a remoção de mielina inibitória, segregada pelos oligodendrócitos [1][3][19][18].

A resposta do sistema imunitário a uma lesão no SNC tem como finalidade estabilizar rapidamente e proteger a espinal medula, ainda que a formação de uma cicatriz glial condicione o restabelecimento das ligações neuronais e, consequentemente, impeça a recuperação da funcionalidade motora (vide figura 1.4).

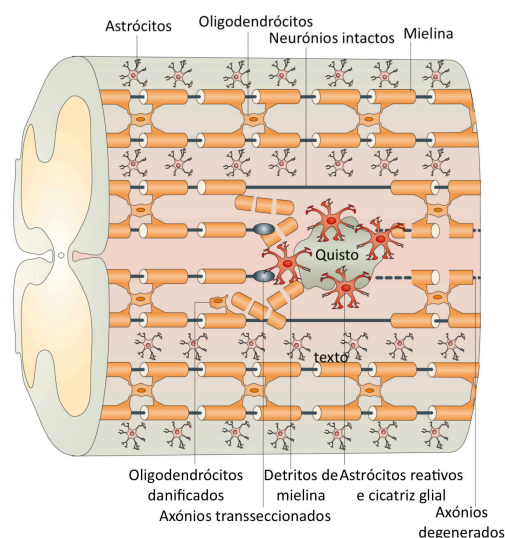


Figura 1.4 – Representação esquemática de uma lesão na espinal medula (adaptado [18]).

1.4 Terapêuticas para lesões na espinal medula

Correntemente, não existe uma única e definitiva abordagem para o tratamento de lesões medulares. As práticas médicas incluem a estabilização e descompressão da espinal medula, acompanhadas da administração de doses elevadas de metilprednisolona por 24 ou 48 horas após a lesão. No entanto, ainda que a medicação procure inibir a peroxidação lipídica (desencadeada como dano secundário após a lesão) e limitar a resposta inflamatória, existem sérios efeitos secundários que podem levar à morte. Para além disso, existe

controvérsia acerca dos efeitos benéficos desta terapêutica. Estes dados refletiram-se na percentagem de prescrições de metilprednisolona, que diminuiu de 76% para 24% em cinco anos [1].

A reparação de lesões na espinal medula tem sido um dos grandes desafios da neurociência, desde que, em 1903, Tello e Cajal demonstraram que neurónios do SNC regeneravam na presença de transplantes do SNP [20]. Procedendo à transplantação de nervo ciático para o córtex cerebral de coelho, verificou-se o crescimento nervoso dos axónios do SNC [21]. Assim começaram as primeiras especulações que os axónios do SNC seriam capazes de regenerar, se sujeitos ao ambiente apropriado [21][22][23][24].

Nas áreas da Engenharia de Tecidos e Medicina Regenerativa têm-se estudado abordagens para o tratamento das lesões da espinal medula que envolvem terapias celular e molecular e a implantação de *scaffolds* tridimensionais produzidos a partir de biomateriais. Até à data, os dispositivos investigados para *scaffolds* incluem os hidrogéis e as condutas neuronais, com ou sem preenchimento, baseadas em estruturas porosas, tais como matrizes de nanofibras. Dada a complexidade do problema, acredita-se que a combinação de diferentes terapias pode representar o caminho certo no tratamento destas lesões.

O transplante celular tem sido amplamente explorado no tratamento de variadas doenças e lesões da espinal medula. É extensa a leitura no que concerne informação de ensaios pré-clínicos *in vivo* que demonstram a capacidade regenerativa das células estaminais. Particularmente nesta área, destacam-se as células estaminais mesenquimais (MSCs – *Mesenchymal Stem Cells*), células de Schwann (SCs – *Schwann Cells*), células estaminais neuronais (NSCs – *Neural Stem Cells*), células da mucosa olfativa (OECs – *Olfactory Ensheathing Cells*), células estaminais embrionárias (ESCs – *Embryonary Stem Cells*), macrófagos ativados e células estaminais pluripotentes induzidas (iPSCs – *Induced Pluripotent Stem Cells*), como ilustra a figura 1.5 [25].

As grandes vantagens da utilização de células estaminais residem no seu potencial de diferenciação, na sua capacidade de secreção de fatores neurotróficos de crescimento (estimulantes da regeneração neuronal), e na sua reduzida imunogenicidade, através da secreção de citocinas anti-inflamatórias [1][24].

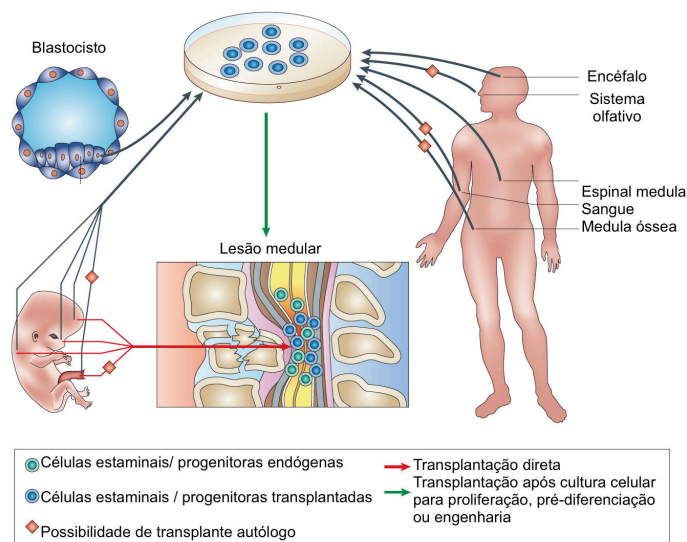


Figura 1.5 – Representação esquemática das potenciais fontes de células estaminais/ progenitoras para transplantação na espinal medula danificada (adaptado [25]).

Nas últimas décadas, tem sido possível compreender os mecanismos reguladores do crescimento, desenvolvimento e extensão neuronais bem como os mecanismos fisiopatológicos associados às lesões medulares. Isto deve-se aos incessantes avanços na biologia molecular em busca de novas terapêuticas, no sentido de atenuar a resposta inflamatória e potenciar a regeneração nervosa, perante um cenário de lesão na espinal medula [1][24].

Independentemente dos avanços da terapia celular, molecular ou nos biomateriais, nenhuma das abordagens por si só resulta na recuperação da função motora. Cada uma destas três componentes apresenta vantagens únicas e insubstituíveis naquele que é o objetivo comum – a regeneração axonal. As células quando expostas a um ambiente tão hostil como o ambiente da lesão, não sobrevivem naquelas condições de hipoxia e isquemia. Também a terapia molecular de nada serve sem um substrato consistente e adequado à regeneração neuronal, onde neurónios e células de reparação endógena possam aderir. Os biomateriais não substituem as células perdidas aquando da lesão, sendo difícil modular as suas propriedades a uma única resposta específica. Assim, é importante tomar como vantagem o que de único cada abordagem apresenta, combinando-as de forma sinérgica [3].

De uma forma geral, a neurogeneração engloba o crescimento de neurites, a remodelação da configuração neuronal e a regeneração de novas células nervosas. O *scaffold* terá de permitir a superação do ambiente inibitório e a organi-

zação espacial adequada ao correto desenvolvimento e funcionamento das células nervosas. Diferentes micro e nano-estruturas tridimensionais de diferentes polímeros influenciam as características do *scaffold*, condicionando o seu propósito e a sua eficácia.

A escolha dos biomateriais, juntamente com o processo de produção, irá determinar a características físico-químicas do *scaffold*, as interações que este estabelecerá com as células e, conseqüentemente, o seu sucesso. Os polímeros, quer sejam naturais ou sintéticos, são materiais amplamente utilizados na fabricação de *scaffolds*, tanto pela grande diversidade como pela versatilidade. Os polímeros naturais (quitosano, colagénio, ácido hialurónico, etc.) são biodegradáveis, apresentam boa biocompatibilidade, possuem locais de reconhecimento celular e reduzida imunogenicidade, mas fracas propriedades mecânicas. O potencial do colagénio na regeneração da espinal medula permanece indeterminado. Sendo um constituinte da cicatriz fibrosa que se forma aquando da lesão, pode promover a extensão de neurites ao mesmo tempo que liberta fatores de inibição e impede a regeneração axonal [12][26]. Midha *et al.* afirmam até que hidrogéis de elevadas concentrações de colagénio (1,92 e 2,56 mg/ml) atuam como impedimento físico à regeneração [27][28]. Os polímeros sintéticos, por sua vez, podem ser modificados de forma controlada para adquirirem certas propriedades físico-químicas, mas apesar da sua variedade, quando utilizados isoladamente, apresentam desvantagens ao nível da interação célula-material. É importante que se assegure a sua biocompatibilidade e biodegradabilidade adequadas. A combinação de polímeros visa encurtar desvantagens e permitir modular a atividade celular tendo em vista a regeneração [12].

Em suma, a utilização de um *scaffold* polimérico adequado, poderá proporcionar uma difusão de fatores de crescimento e orientação de contacto eficazes à regeneração nervosa. A possibilidade de aplicar estimulação elétrica às células nervosas só é possível se o *scaffold* possuir propriedades condutoras. A utilização conjunta de polímeros biocompatíveis e de polímeros condutores poderá permitir a estimulação elétrica de células nervosas o que poderá potenciar processos celulares que contribuam para a regeneração de lesões da espinal medula. Os polímeros condutores também podem funcionar como interface de libertação controlada de biomoléculas [29].

1.5 *Scaffolds* de polímeros condutores

Na última metade do século XX, a influência da estimulação elétrica de baixa frequência na regeneração nervosa tem sido amplamente investigada, tendo provado tratar-se de uma abordagem muito promissora no que concerne a proliferação e diferenciação celulares. Várias investigações *in vivo* têm confirmado a importância da estimulação elétrica na extensão de neurites de nervos transeccionados e na recuperação da função motora, imediatamente ou algum tempo após o trauma [7][8][9][10][30]. A introdução de polímeros condutores no suporte onde se cultivam as células/tecidos permite estimulá-las através do *scaffold*. Do ponto de vista clínico, um *scaffold* condutor é um melhor método de implementação da estimulação do corpo humano.

Os polímeros condutores, ou “metais sintéticos”, que nos finais do século XX eram considerados “intratáveis” devido à sua insolubilidade, providenciam, presentemente a junção das propriedades físicas e químicas dos polímeros orgânicos e as propriedades elétricas dos metais. As suas baixas impedâncias, entre 10 k Ω e 100 k Ω , tornam estes materiais semicondutores extremamente atraivos para a construção de condutas neuronais.

O polipirrole (PPy), o polímero condutores mais amplamente investigado, apresenta notável biocompatibilidade *in vitro* e *in vivo*, razoável estabilidade química ao ar e aos solventes e capacidade de atingir valores elevados de condutividade (160 S/cm) [31]. No entanto, após síntese, a alteração da estrutura molecular dá origem a um polímero de difícil processamento, rígido, frágil e insolúvel, suscetível a desprotonações e *dedoping* [32].

A polianilina (PANi), polimerizada a partir do monómero de anilina, pode encontrar-se num de três estados de oxidação: leucoesmeraldina, esmeraldina e pernigranilina. A sua forma condutora, a esmeraldina, é de fácil síntese, baixo custo, boa estabilidade ambiental e razoável condutividade (100 S/cm) [31]. No entanto, a sua utilização em aplicações biológicas encontra-se limitada pela sua reduzida biodegradabilidade e biocompatibilidade, bem como a baixa processabilidade e flexibilidade.

O PEDOT, um polímero da família do politiofeno, tem-se vindo a destacar pela sua reduzida *band gap* e baixo potencial redox. A fácil dopagem deste polímero e a sua elevada estabilidade físico-química e ambiental, conferem ao PEDOT condutividade e estabilidade térmica superiores às do PPy (210 S/cm) [31].

Estudos levados a cabo por Shi *et al.* indicam que a estimulação elétrica de *scaffolds* de polipirrole por aplicação de um campo elétrico de 100 mV/mm demonstrou melhores resultados de viabilidade celular face à aplicação direta

de corrente elétrica de 2,5 a 250 $\mu\text{A}/\text{mm}$ [33]. A estimulação elétrica DC a 100 Hz, 1V-2V, com pulsos de 10 ms, de filmes de PEDOT:PSS demonstrou favorecer a extensão de neurites e alongação de neurónios de NSCs, orientando o movimento das células *in vitro* [34]. A aplicação de estimulação elétrica intermitente, a 20 Hz, 3V, também provou promover a regeneração e remielinização axoniais numa lesão do nervo ciático, recorrendo a um *scaffold* condutor de polipirrole e quitosano [11]. A estimulação de *scaffolds* de polipirrole sementeados com células PC12 com 10 μA de corrente constante ou 20 Hz de corrente alternada por 1h/dia, evidenciaram um aumento significativo da percentagem de células com neurites, número de neurites por célula e tamanho destas [35]. Uma forma simples e eficaz de diminuir a resistividade dos materiais, aumentando a condutividade dos extratos obtidos, passa por aumentar a proporção oxidante: EDOT [36], potenciando a dopagem do polímero.

Scaffolds de nanofibras

A migração de células e os mecanismos de interações entre estas e um *scaffold* dão-se à nanoescala. Os locais de adesão molecular na membrana celular situam-se entre os 5 e os 200 nm, daí que também a secreção de moléculas de adesão neuronal (N-CAM, N-caderina e integrinas) seja sensível à nanotopografia do *scaffold* [1][2][29]. Nos processos de regeneração neuronal, as células nervosas demonstram uma preferência por superfícies rugosas na mesma ordem de grandeza que elas, cerca de 1 a 100 μm (nanofibras ou nanotubos) [5]. *Scaffolds* de fibras submicrométricas distinguem-se na sua capacidade em recriar uma estrutura semelhante à dos tecidos biológicos [37]. Quando produzidas com um alinhamento preferencial, permitem a extensão paralela das neurites por orientação de contacto.

A eletrofiação é um método muito utilizado para a produção de *scaffolds*. Membranas de nanofibras condutoras podem ser obtidas por eletrofiação de uma solução de um polímero condutor conjuntamente com outros polímeros como o quitosano, a poli (caprolactona) (PCL) ou a gelatina ou por cobertura química, com o polímero condutor, de uma matriz de nanofibras de um outro polímero. Num estudo realizado por Ghasemi-Mobarakeh *et al.*, procedeu-se à adição de PANi dopada a uma solução de PCL/gelatina (PG) (70/30) a qual foi posteriormente eletrofiada. Após cultura de NSCs no *scaffold* produzido, as amostras que foram estimuladas eletricamente evidenciavam uma maior proliferação celular e crescimento de neurites do que os *scaffolds* PANi/PG que não tinham sido sujeitos a estimulação [38].

A junção de um biopolímero à solução de polímero condutor traduz-se, geralmente, numa diminuição da condutividade. Isto pode ser contornado pela aplicação de uma camada de polímero condutor sobre as nanofibras biopoliméricas eletrofiadas. Estes *coatings* de polímero condutor são, muitas vezes, levados a cabo por polimerização química em fase gasosa ou submersão. De acordo com o trabalho desenvolvido por Lee *et al.* matrizes de nanofibras de ácido poliglicólico (PLGA) foram submersas numa solução de pirrole/para-tolueno sulfato (Py/pTS), a reação de polimerização foi iniciada com FeCl₃ (cloreto de ferro III), e mantida por 24 horas a 4° C. O resultado da cultura com células neuronais demonstrou que as matrizes PPy/PLGA potenciaram o crescimento e diferenciação de células PC12 e neurónios hipocámpais, comparativamente às matrizes não recobertas. Após estimulação elétrica, as células PC12 exibiam cerca de 40 a 90% mais neurites e que estas eram cerca de 40 a 50% mais longas, comparativamente aos *scaffolds* não estimulados [39].

Mais recentemente, as matrizes de nanofibras de PEDOT têm ganho grande destaque na produção de *scaffolds* neuronais. O trabalho de Valle *et al.* deu o mote na investigação da biocompatibilidade de filmes de PEDOT quando em cultura com células epiteliais, não sendo detetada qualquer citotoxicidade [40]. Mas mais recentemente, destacam-se as contribuições de Abidian *et al.* na exploração das diversas abordagens ao PEDOT. Na vasta gama de publicações, incluem-se:

- A libertação controlada de biomoléculas e fármacos em locais específicos com recurso à estimulação de nanotubos de PEDOT [41].
- A análise da biocompatibilidade de filmes e nanotubos de PEDOT e PPy em cultura com células do gânglio espinal. Neste caso, os nanotubos mantiveram-se aderentes ao eléctrodo enquanto que os filmes se deterioraram, sendo mais evidente nos filmes de PEDOT devido à sua maior rigidez. No entanto, os nanotubos de PEDOT demonstram melhor adesão celular, neurites mais longas e menos ramificações [42].
- A aplicação *in vivo* de condutas neuronais produzidas a partir de hidrogel de agarose revestido, totalmente e parcialmente, por uma fina camada de PEDOT. A conduta parcialmente revestida apresentou uma melhor regeneração axonal devido à eficiente difusão de biomoléculas e nutrientes para o seu lúmen [43].

Assim, *scaffolds* fibrosos de dimensões submicrométricas capazes de incorporar fatores neurotróficos e estimular eletricamente as células, poderão ser o

ponto de partida *scaffolds* mais promissores e ambiciosos como as condutas neuronais, como é notório na figura 1.6 [44].

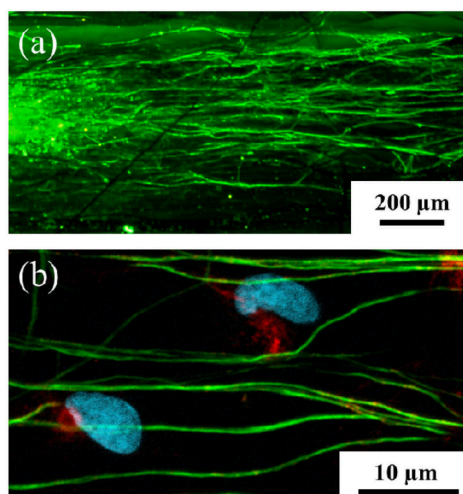


Figura 1.6 - Morfologia das fibras alinhadas de PEDOT/PLGA e de células DRG (*Dorsal Root Ganglia*) após cultura nessas matrizes. a) Imagem confocal das neurites dos DRG após marcação com β -tubulina, que indica que as neurites tendem a seguir o alinhamento das fibras. b) Marcação nuclear com DAPI (azul) e proteína s100 (vermelho) que permite a co-localização das células de Schwann [44].

1.6 Processo de condução

Os materiais que, do ponto de vista de condução de carga, podem ser metais, semicondutores ou isolantes diferem entre si pelo tamanho da *gap* que separa as suas bandas de valência e de condução. Nas moléculas que os compõem, as orbitais atômicas coalescem formando orbitais moleculares com níveis energéticos quantizados e definidos. Ao passo que as orbitais menos energéticas estão preenchidas e são, geralmente, ligantes, as orbitais mais energéticas estão, na sua maioria, por preencher e possuem características antiligantes.

É precisamente no arranjo estrutural 3D das moléculas que os estados energéticos ligantes e antiligantes se rearranjam e se formam as bandas de condução e valência, como exemplificado na figura 1.7. Dentro das bandas os estados eletrônicos estão muito próximos podendo admitir-se que se distribuem continuamente em energia. A banda de valência é a banda ocupada de maior energia enquanto que a banda de condução é a banda desocupada de menor energia.

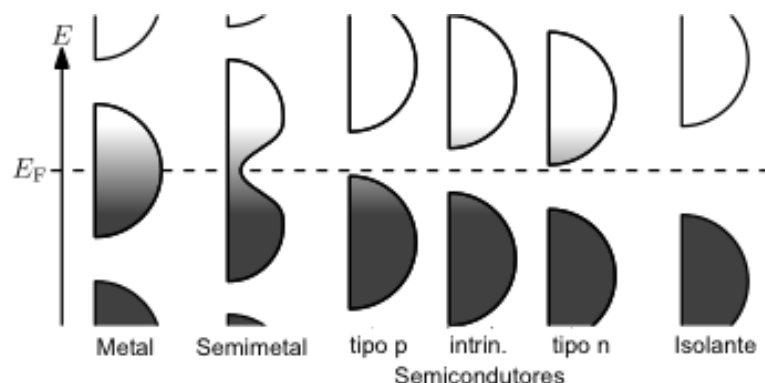


Figura 1.7 - Preenchimento dos estados eletrônicos em equilíbrio termodinâmico. Trata-se de um gráfico energia *vs.* densidade de estados para cada energia (adaptado de Wikimedia Commons). Nesta imagem, é possível acompanhar a gradação de tons de cinza que segue a distribuição de Fermi-Dirac, sendo que a preto todos os estados se encontram ocupados e a branco nenhum estado está ocupado.

Para que haja condução elétrica é necessário que alguns elétrons transitem da banda de valência para a banda de condução.

No caso dos metais, as bandas de valência e de condução sobrepõem-se, constituindo uma banda única, isto é, alguns elétrons de valência podem mover-se pelo material assegurando a condução elétrica. A $T=0$ (temperatura=0), sem energia térmica, é possível distinguir-se níveis ocupados e não ocupados nesta banda, já que os elétrons não estão excitados. O nível de Fermi é precisamente definido como sendo o nível de energia mais alto que se encontra ocupado a $T=0$. À medida que T aumenta, maior a excitação e mais elétrons ocupam níveis superiores, não existindo distinção entre níveis ocupados e desocupados. A distribuição de Fermi-Dirac descreve esta população de estados na banda de acordo com a variação da temperatura. A energia de Fermi é o nível energético hipotético de um elétron que, em equilíbrio termodinâmico, teria 50% de probabilidade de estar ocupado, dependendo, portanto, da temperatura. A condutividade dos metais diminui com o aumento da temperatura pois esta determina o aumento das colisões entre átomos e elétrons, o que torna o transporte de cargas menos eficiente.

No caso de semicondutores e isolantes, as bandas de valência e de condução estão separadas por uma *band gap*. A $T=0$, os estados eletrônicos na banda de valência de um semicondutor encontram-se completamente preenchidos,

enquanto que a banda de condução se encontra vazia. Com o aumento da temperatura, a excitação eletrônica determina a movimentação de elétrons da banda de valência para a banda de condução. A distinção entre semicondutores e isolantes reside no tamanho da *band gap*, sendo que, no caso dos isolantes, a *gap* é demasiado grande para que um número considerável de elétrons atinja a banda de condução. Nos semicondutores a condutividade aumenta com a temperatura pois mais elétrons atingem a banda de condução [36].

Polímeros saturados e polímeros conjugados

A abrangente classe dos polímeros condutores engloba os polímeros condutores eletrônicos e os polímeros condutores iônicos, também denominados por eletrólitos poliméricos. Os polímeros condutores eletrônicos também incluem os polímeros condutores conjugados e as misturas de polímeros isolantes e condutores. Neste trabalho, os polímeros condutores restringem-se aos polímeros condutores conjugados, dopados ou não [45].

Nos polímeros saturados, todos os elétrons de valência estão a ser utilizados para estabelecer ligações covalentes σ , pelo que a *band gap* é muito grande e estes polímeros possuem características isolantes.

No caso dos polímeros conjugados, os átomos de carbono que estão geralmente envolvidos na formação da cadeia polimérica, podem estabelecer quatro ligações: três ligações fortes σ com átomos de carbono vizinhos e uma ligação fraca π (entre duas orbitais p). Na figura 1.8, o poliacetileno, um polímero conjugado de estrutura química simples, é utilizado como exemplo ilustrativo dos princípios de condução nos polímeros condutores [46]. Como se pode observar, existem dois elétrons π nos carbonos 1 e 2 e, se as ligações carbono-carbono fossem igualmente longas, então os elétrons π seriam encontrados numa banda contínua semipreenchida. Tal material evidenciaria propriedades metálicas, como condutividade maior que 0 a $T=0$ e diminuição da condutividade com o aumento da temperatura [36].

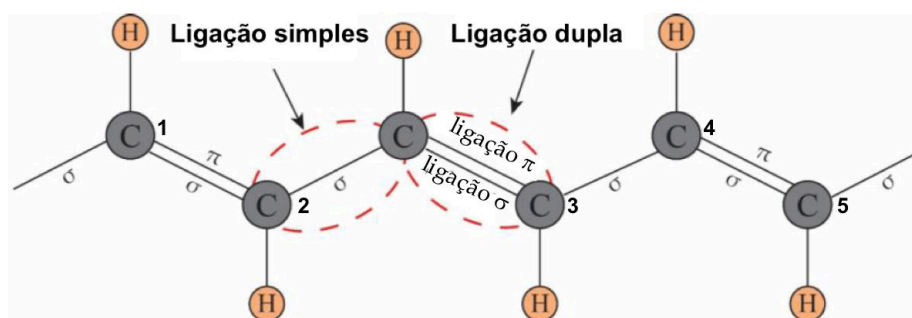


Figura 1.8 – Estrutura química do poliacetileno, onde é possível observar as ligações duplas conjugadas. A característica eletrônica comum a todos os polímeros conjugados puros é a presença de ligações simples e duplas conjugadas ao longo da cadeia polimérica (adaptado [46]).

De acordo com o teorema de Peierl: “Uma cadeia unidimensional, igualmente distribuída, com um elétron por íon é instável”. Nestes compostos encadeados existe, portanto, um rearranjo da estrutura periódica por causa dos elétrons π livres. Este rearranjo conduz a oscilações das posições atômicas de modo a diminuir a energia das orbitais eletrônicas preenchidas, como está representado na figura 1.9. Este fenómeno é energeticamente favorável no sentido em que estas distorções levam à formação de menores *band gaps*. A *gap* energética entre uma banda π preenchida e uma banda π^* vazia, torna-se menor que a energia necessária ao rearranjo dos átomos de carbono. Esta estrutura alternante é típica de todos os polímeros conjugados e, dado que não há bandas semi-preenchidas, estes polímeros são, geralmente, semicondutores.

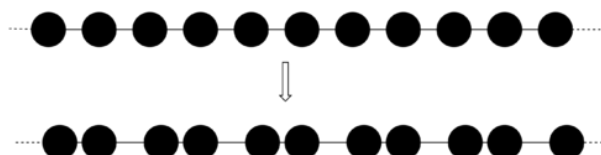


Figura 1.9 - Distorção de Peierl. Quando dois íões se aproximam, a energia associada ao aumento da distância da ligação entre os pares de íões é suplantada pelo ganho energético associado à formação de uma ligação mais próxima (adaptado de Wikimedia Commons).

Dopagem

Os polímeros condutores caracterizam-se por cadeias de ligação dupla C=C conjugadas. Estas orbitais π podem receber ou doar elétrons em condições de redução ou oxidação, respetivamente, permitindo o fluxo de elétrons. A formação de um íão, por ação de um agente chamado de dopante, converte o polímero de isolante para condutor. O processo de condução dá-se, então, por cargas deslocalizadas ao longo da cadeia polimérica que são anuladas pela entrada e saída de cátions ou aniões. A síntese de polímeros condutores pode ser química, por polimerização de condensação ou adição, ou eletroquímica, que permite a oxidação de um monómero por aplicação de um potencial.

O processo de dopagem é um método que permite a criação de bandas intermédias que irão facilitar o transporte das cargas da banda de valência para a banda de condução. Assim que as cargas introduzidas nos polímeros ou nos oligómeros pelos dopantes são “armazenadas” em estados novos intermédios que implicam sempre uma alteração estrutural e elétrica, são eles os polarões, bipolarões ou solitões.

No caso em estudo, na oxidação do EDOT, existe a formação de um polarão. Este é formado quando apenas um eletrão é adicionado ou removido da cadeia polimérica conjugada. Caracteriza-se pela transição de um nível eletrónico, composto por dois eletrões (de *spin* emparelhado) respetivamente da banda de valência e da banda de condução, para a *gap*. Existem dois tipos de polarões: os eletrónicos e completos. No caso de um polarão eletrónico, o eletrão adicionado é armazenado no nível intermédio formado a partir da banda de condução. No caso do polarão completo, o eletrão é removido do nível recém-formado a partir da banda de valência. De ambos os casos, resulta um nível semipreenchido com $\text{spin } \frac{1}{2}$. A diferença de energia entre o limite da banda e do estado intermédio criado depende da *band gap* e do tamanho da cadeia polimérica.

Estudos indicam que PEDOT sintetizado quimicamente (não-dopado) consiste, maioritariamente, de polímero no estado neutro [47]. No entanto, o seu estado verdadeiramente neutro implicaria condutividades da ordem de 10^6 a 10^{10} S/cm, dependendo da pureza (quanto mais baixa, mais puro), o que não acontece. Estudo levados a cabo por Yamamoto e Ablá [48], demonstraram rendimentos reduzidos na síntese de PEDOT neutro não-condutor, verificando a ocorrência de oxidação após a síntese. O tratamento com hidrazina é adequado ao *dedoping* de polímeros como a PANi e o politiofeno. No entanto, estes investigadores concluíram que, mesmo lavado com hidrazina, o PEDOT sintetizado por oxidação continha vestígios de FeCl_4^- (resultante da reação com o oxidante, FeCl_3), que elevavam significativamente a condutividade do PEDOT, servindo de dopante.

Estruturas poliméricas

A estrutura dos polímeros conjugados é pouco regular dado que estes são compostos por moléculas individuais – os monómeros – que, por sua vez, originam cadeias poliméricas de tamanho variável. Aliados a este facto estão também a uniformidade da polimerização e a orientação das cadeias em *x*, *y* e *z*. Todos estes fatores influenciam a cristalinidade e as propriedades eletrónicas dos polímeros conjugados.

Uma maior cristalinidade e, portanto, uma maior organização da estrutura tridimensional, traduz-se, na maioria dos casos, numa maior condutividade. No entanto, num sistema muito organizado e cristalino, o transporte de cargas torna-se mais difícil devido à dificuldade da difusão de cargas de uma cadeia para a outra. A organização de um dado material refere-se à regularidade

com que os átomos aparecem numa determinada estrutura tridimensional. No estudo de filmes de PEDOT dopados com tosilato por difração de raios X, é proposto um modelo estrutural para-cristalino cuja organização diminui com o aumento da distância, evidenciando a anisotropia do material [49]. O grau de organização dos polímeros conjugados influencia, portanto, o transporte de carga nos polímeros conjugados como o PEDOT.

Neste sentido, os modelos de desordem heterogênea são de grande interesse para explicar a condutividade e magnetorresistência do PEDOT: PSS (PEDOT: poli (estirenosulfonato)) em função da temperatura [50]. No entanto, a baixa densidade de transportadores de cargas não pode somente ser explicada pela heterogeneidade do material, sendo determinada por interações muito mais complexas no que concerne a competição entre transferências de cargas inter-cadeias e localização de cargas induzidas pela desorganização da estrutura tridimensional [51].

2 Materiais e Métodos

Apresentam-se, de seguida, os materiais e métodos utilizados na polimerização do monómero de EDOT na presença de CS para obtenção do híbrido CS/PEDOT, bem como para a obtenção das soluções em que este material foi introduzido e a partir das quais foram produzidos filmes e eletrofiadas matrizes de nanofibras.

2.1 Materiais

Não sendo os polímeros condutores, tais como o PEDOT, biodegradáveis, a produção de *scaffolds* a partir deles não é atrativa para a Engenharia de Tecidos. Uma forma de tirar partido das suas propriedades condutoras para aplicação em Engenharia de Tecidos passa pela introdução de solubilidade, biodegradabilidade e biocompatibilidade nos polímeros condutores, utilizando-os em combinação com polímeros biodegradáveis. Neste trabalho optou-se por combinar PEDOT com o CS –um polímero biocompatível e biodegradável –, desde logo no processo de síntese do PEDOT.

Do ponto de vista químico, o CS apresenta uma estrutura molecular similar à dos glicosaminoglicanos, macromoléculas integrantes da matriz extracelular, o que pode facilitar o reconhecimento por parte das células. As propriedades físicas do PEDOT podem ser otimizadas de acordo com a aplicação pretendida através da funcionalização da sua superfície. A funcionalização do polímero através da ligação de biomoléculas e/ ou adição de cadeias laterais pos-

sibilitam a orientação físico-química e biológica necessárias à biocompatibilidade do PEDOT e à promoção da adesão/ proliferação celulares na interface polímero-tecido. Ao contrário de outros polímeros condutores, o PEDOT, é um polímero muito estável, mantendo a sua elevada condutividade após contacto prolongado com os tecidos. A sua impedância tem-se mostrado menor do que a de outros polímeros condutores, tais como o polipirrole (PPy) [31][52][53][54].

A produção dos *scaffolds* condutores envolveu dois passos. Num primeiro passo procedeu-se à polimerização de EDOT numa solução de CS em ácido acético para a obtenção de *pellets* de um híbrido CS/PEDOT. Para a polimerização foram usados dois oxidantes: FeCl_3 e persulfato de amónia (APS). Num segundo passo, redissolveu-se o CS/PEDOT em soluções a eletrofiar.

2.1.1 Quitosano

A quitina é um polímero natural muito abundante, presente nas paredes celulares de fungos e no exosqueleto de insetos [55]. O quitosano (CS) é um copolímero natural e linear, pertencente à família dos polissacarídeos que é obtido através da N-desacetilação parcial alcalina da quitina. No processo de desacetilação ocorre hidrólise do grupo acetil nas unidades N-acetilglucosamina e este grupo é substituído por um hidrogénio resultando numa unidade D-glucosamina. As especificações do polímero incluem o peso molecular (*Molecular Weight*, M_w) e o grau de desacetilação (*Deacetylation Degree*, DD), isto é, o valor médio da proporção entre o número de unidades D-glucosamina e o total de unidades ao longo de uma molécula. A designação CS é atribuída quando o DD se torna próximo de 50%.

Na figura 2.1 é possível observar a estrutura química do quitosano, composto por uma unidade desacetilada D-glucosamina e por uma unidade acetilada N-acetil-D-glucosamina [56].

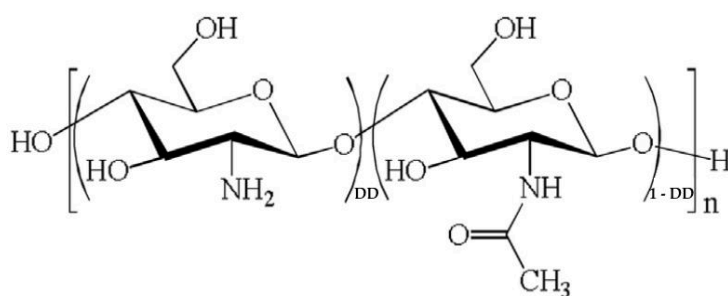


Figura 2.1 - Estrutura química do quitosano (adaptado [56]). Do lado esquerdo encontra-se a unidade D-glucosamina, que se encontra desacetilada (DD) e do lado direito a N-acetil-D-glucosamina, que se encontra acetilada (1-DD).

O grau de desacetilação influencia as propriedades físico-químicas e biológicas do polímero como, por exemplo, a solubilidade [56]. Quanto maior for o DD, maior a solubilidade e maior a taxa de degradação. A degradação do CS é um processo que, fisiologicamente, ocorre por ação de enzimas.

Para dissolver o CS ou se desprotonam os grupos OH ou se protona os grupos NH₂. A protonação é mais fácil e converte o polímero num polieletrólito catiónico [57]. O CS, que é considerado uma base forte, é assim solúvel em soluções aquosas ácidas de pH inferior a 6.0 (ácido acético ou fórmico), ao contrário da quitina, que é insolúvel na grande maioria de solventes orgânicos. A solubilidade do CS é ainda condicionada pelo peso molecular [58].

A presença de grupos amina (NH₂) e hidroxilo (-OH) conferem reatividade à molécula de quitosano uma vez que estes grupos são muito facilmente sujeitos a modificações químicas. Tais modificações podem alterar as propriedades físicas e mecânicas do CS.

O quitosano, tal como o FeCl₃, é conhecido pelas suas propriedades coagulantes-floculantes. O processo de coagulação-floculação é maioritariamente induzido pela presença de sais metálicos inorgânicos, como o FeCl₃ e o FeSO₄. No entanto, a utilização conjunta do quitosano com esses sais diminui a quantidade de coagulante necessária, potenciando o seu efeito. Este polímero é considerado um biofloculante muito eficaz na remoção de contaminantes da água, facilitando a complexação de aniões metálicos em soluções ácidas [59]. No processo de polimerização, esta característica do CS e do FeCl₃ demonstra ser determinante para a concentração de ácido acético a utilizar. A concentrações mais elevadas de ácido acético, verificou-se a formação quase imediata de um aglo-

merado “borrachoso”, onde não existia dispersão completa do oxidante e, consequentemente, também não ocorria a polimerização homogênea do monómero.

O CS tem sido alvo de inúmeros estudos pois revela propriedades muito próprias e adequadas à utilização na área de Engenharia de Tecidos, como o facto de ser biodegradável, biocompatível, não-citotóxico, anti-tumoral, bioaderente, anti-microbiano e hemostático [56][60].

2.1.2 EDOT/PEDOT

Uma das etapas deste trabalho é a polimerização do EDOT por oxidação química. A tabela 2.1 apresenta algumas das propriedades físicas do monómero, sendo que a propriedade que se mostrou mais relevante foi a sua baixa solubilidade em água [36].

Tabela 2.1 - Propriedades físicas do monómero EDOT (adaptada [36]).

Viscosidade (20°C)	11 mPa.s
Densidade (20°C)	1,34 g/cm ³
Ponto de fusão	10,5° C
Ponto de ebulição (1013 mbar)	225° C
Pressão de vapor (20°C)	0,05 mbar
Pressão de vapor (90°C)	10 mbar
Solubilidade em água (20°C)	2,1 g/L
Ponto de inflamação	104° C
Ponto de autoignição	360° C

O PEDOT é um polímero conjugado, cuja conformação linear facilita o transporte de cargas elétricas. Quando dopado, é transparente e altamente condutor. Para além de muito estável face à oxidação, mais até que o seu monómero [61], é considerado o derivado de maior destaque do politiofeno, exibindo baixa impedância e valores de condutividade até 210 S/cm, elevada biocompatibilidade, elicitando uma reduzida resposta inflamatória [31]. O PEDOT carac-

teriza-se por uma cor azul escura no seu estado reduzido e azul clara no seu estado oxidado [62]. Uma das maiores barreiras associadas ao uso de polímeros condutores é a sua insolubilidade e impossibilidade de processamento por derretimento.

Os sais de ferro-III não só polimerizam o EDOT como, subsequentemente, os aniões metálicos, como o Cl^- para o caso do FeCl_3 , permitem a dopagem do polímero, aumentando a sua condutividade. A presença de ácido nesta reação catalisa a oxidação do monómero, originando polímero não-dopado pronto a reagir com o anião metálico dopante. Para garantir uma menor dopagem, resultando em resistividades mais altas, mas mais adequadas à regeneração axonal (cerca de 1 a 10 $\text{k}\Omega\cdot\text{m}$), deve-se evitar excesso estequiométrico de FeCl_3 face ao EDOT utilizado (em que excesso se entende por valores superiores a 1:1 FeCl_3 :EDOT), sendo que o rendimento da síntese de PEDOT absolutamente neutro será sempre limitado [36][35][63].

Uma outra limitação do monómero prende-se com a sua utilização em conjunto com compostos halogenados. Estes últimos, devido à sua baixa estabilidade, que tende a reduzir ainda mais com o aumento do tempo e com a diminuição da temperatura (em armazenamento, por exemplo), induzem a “auto-oxidação” do EDOT em PEDOT [36].

É o processo de dopagem que induz polaridade ao polímero, tornando-o condutor. No caso de existir *p-doping*, o PEDOT é oxidado e terá carga positiva, no caso de *n-doping*, o PEDOT é reduzido e terá carga negativa. Este processo ocorre durante a síntese do polímero, sendo que os dopantes podem ser separados em três categorias de acordo com o seu tamanho molecular:

- grandes polímeros dopantes, como o poli (estireno sulfonato) (PSS).
- pequenos sais iónicos dopantes, como o Cl^- .
- dopantes bioespecíficos, como os péptidos, proteínas e neurotrofinas [52].

Todos afetam a condutividade e estrutura dos polímeros, no entanto, os grandes dopantes podem também afetar a densidade do polímero, integrando-se nele; não desaparecendo com tempo ou estimulação, o que, de certa forma, confere maior estabilidade.

Os polímeros condutores podem ser sintetizados por oxidação química ou eletroquímica. A polimerização química do EDOT pode, por sua vez, ser feita por fase de vapor ou em solução (menos comum).

A polimerização por fase de vapor *in-situ* (*Vapor Phase Polymerization* (VPP)) de monómeros de EDOT consiste no revestimento da superfície de uma amostra sólida com um oxidante (por exemplo, solução de FeCl_3 ou APS) e consequente exposição a uma atmosfera controlada de vapores de monómero. Este método é muito utilizado presentemente, demonstrando valores de condutividade elevados para o caso de nanofibras eletrofiadas (cerca de 60 S/cm) e posteriormente revestidas por VPP. No entanto, este revestimento acaba por não possuir as propriedades físico-químicas ideais às interações entre as células e o material, sobretudo de NSCs [64][65][66].

A polimerização de monómeros de EDOT em solução aquosa ácida foi o método selecionado para este trabalho, utilizando um agente oxidante, como por exemplo, o FeCl_3 , o $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ ou o persulfato de amônia (APS). A polimerização do EDOT em solução permitiu não só contornar o problema da biodegradabilidade com a funcionalização do polímero através do CS, como da sua insolubilidade e dificuldade de processamento, de forma eficiente e barata. A otimização das propriedades PEDOT dá-se por inclusão das moléculas de CS dentro do polímero. Isto é possível através da mistura do monómero do polímero, do solvente e do biopolímero antes da polimerização. As moléculas do agente funcionalizante (CS) são assim incorporadas no polímero durante a reação [52].

A polimerização eletroquímica consiste na aplicação de corrente a soluções aquosas dopadas com contra-íons como o ClO_4^- , o dodecil sulfato de sódio (NaDS) ou o PSS^- . A deposição eletroquímica pode ser feita por corrente constante (galvanostática), voltagem constante (potenciostática) ou por alternância do potencial em ciclos, conduzindo a deposições alternadas (potenciodinâmica). Nos três casos se depositam filmes de PEDOT diretamente num eletrodo condutor [52].

Passível de variadas aplicações - como sonda neuronal, na forma de eletrodos implantáveis ou como dispositivo de armazenamento e libertação controlada de fármacos (*drug delivery*) -, o PEDOT tem sido explorado enquanto alternativa do PPy e da PANi devido à sua ótima transparência, elevada estabilidade térmica, notável biocompatibilidade e estabilidade face à desprotonação e *dedoping* em meio fisiológico [67].

Na figura 2.2 é possível observar a estrutura química do PEDOT, resultante da reação do monómero com o oxidante [68].

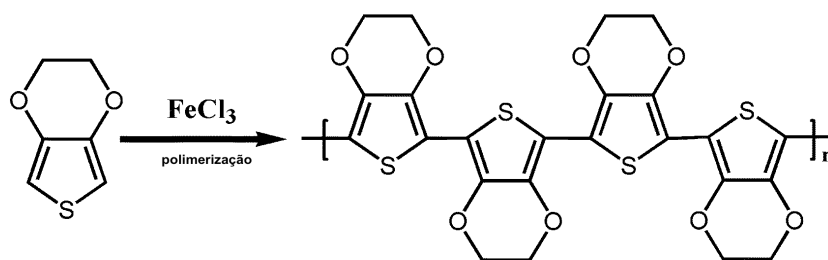


Figura 2.2 - Polimerização de EDOT (esquerda) em PEDOT (direita) por oxidação com FeCl_3 (adaptado [68]).

Na figura 2.3 é possível observar a estequiometria da reação de polimerização do EDOT, bem como o efeito de dopagem resultante da presença do íon Cl^- do tetracloreto de ferro [36].

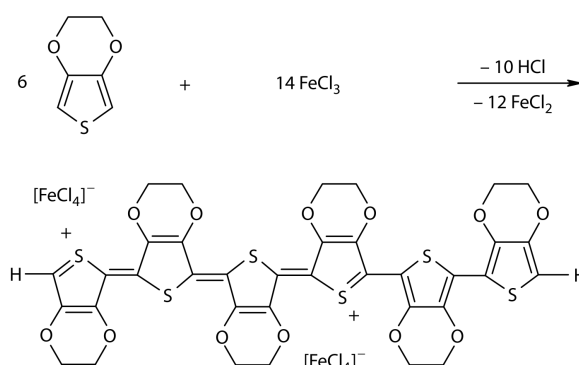


Figura 2.3 – Reação de polimerização e dopagem do PEDOT (adaptado [36]).

2.1.3 Cloreto de ferro (III)

O cloreto de ferro (FeCl_3), também apelidado de cloreto férrico, é um sal inorgânico de cor laranja, solúvel em água, etanol e ácido acético glacial. Neste trabalho não se utilizou a forma anidra (FeCl_3) mas sim a forma hexahidratada ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) do sal. A sua dissolução em água trata-se de um processo exotérmico à temperatura ambiente, originando hidróxido de ferro. A solução que se origina é ácida e corrosiva, com cor laranja escuro, conhecida pelo seu efeito floculante. A deposição de óxido de ferro III ($\text{Fe}(\text{OH})_3$) pode ser observada ao

longo do tempo, sendo premente a preparação da solução apenas quando esta é para ser utilizada, na forma de hidróxido de ferro.

Na figura 2.4 é apresentada a estrutura química do $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

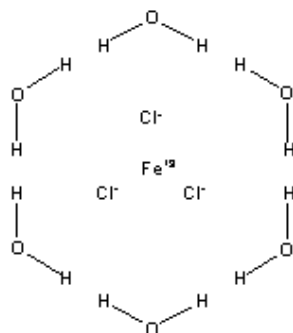


Figura 2.4 – Estrutura química do cloreto de ferro (III) hexahidratado (adaptado de Wikimedia Commons).

2.1.4 Persulfato de amónia (APS)

O APS é um sal inorgânico branco de elevada solubilidade em água, tratando-se, contudo, de um processo endotérmico. A absorção de energia não necessita de ser obrigatoriamente na forma de calor, bastando agitar a solução de forma a dissolver todo o sal.

Na figura 2.5 encontra-se a estrutura química do persulfato de amónia.

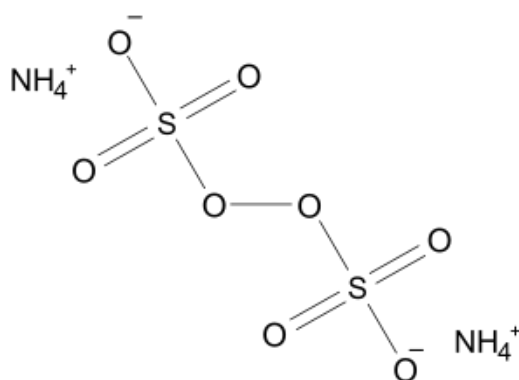


Figura 2.5 – Estrutura química do persulfato de amónia (adaptado de Wikimedia Commons).

2.2 Métodos – Eletrofiação

Neste trabalho foram produzidas por eletrofiação matrizes de fibras alinhadas de CS incorporando o híbrido CS/PEDOT produzido, visando a sua utilização em *scaffolds* através dos quais se possa aplicar estimulação elétrica a células.

O processo de eletrofiação permite obter fibras na ordem da nanoescala, possibilitando a formação de estruturas porosas de elevada área superficial [69]. A facilidade de utilização deste processo para uma vasta gama de soluções poliméricas, aliada à diversidade no controlo da geometria e características mecânicas do *scaffold*, fazem da eletrofiação um método promissor na área da Engenharia de Tecidos. A produção de fibras ultrafinas, sintéticas ou naturais, tem sido empregue em múltiplas aplicações tais como *scaffolds* neuronais, ósseos, cartilaginosos e vasculares [70].

A implementação mais simples do processo permite a deposição de nanofibras orientadas aleatoriamente (fibras desalinhadas). O seu alinhamento requer, pois, a utilização de um coletor cilíndrico rotativo. Nanofibras alinhadas promovem um crescimento unidirecional e regeneração superior dos axónios, comparativamente a nanofibras desalinhadas [71]. Estas fibras alinhadas mimetizam, até certo ponto, a estrutura do tecido neuronal, promovendo a regeneração orientada dos axónios.

Na figura 2.6 podemos observar o esquema de montagem de eletrofiação, cujos componentes principais são: a bomba injetora, a seringa, a agulha, a fonte de alta tensão e o coletor [69]. Na eletrofiação, recorre-se à aplicação de um potencial elétrico elevado (da ordem das dezenas de kV) à agulha de uma seringa com solução polimérica. Essa solução é injetada com um caudal pré-estabelecido, com o auxílio de uma bomba injetora, formando um fio que se desloca em direção ao coletor metálico aterrado.

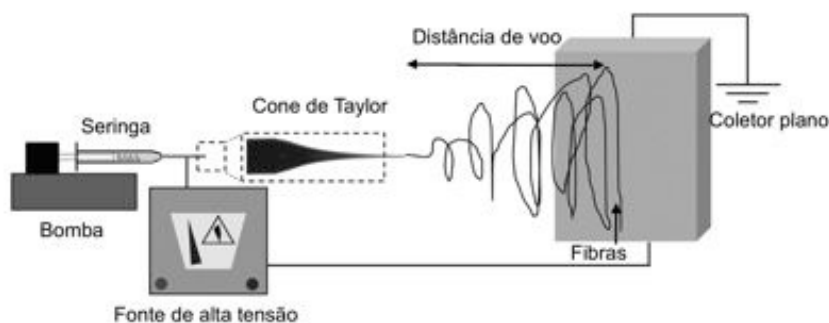


Figura 2.6 - Imagem esquemática da montagem do processo de eletrofiação (adaptado[69]).

No início do processo, quando a tensão superficial da gota de solução polimérica carregada que se forma na ponta da agulha iguala as forças eletrostáticas de repulsão Coulombiana entre cargas, forma-se um jato polimérico a partir da gota deformada (cone de Taylor). O campo eletrostático entre a ponta da agulha e o coletor direciona o fio na direção deste último. No processo, deve existir um certo equilíbrio entre o caudal ejetado e a taxa de extração eletrostática por forma a preservar o Cone de Taylor. A ejeção da solução origina finas fibras que se movem num movimento caótico e instável, consequência das forças de repulsão electrostática. Estas forças estão na origem do estiramento das fibras. O tempo que medeia a ejeção da solução e a deposição das fibras, denominado tempo de voo. Durante este tempo ocorre evaporação do solvente e as fibras acabam por depositar-se no coletor numa estrutura tridimensional porosa de nanofibras.

Tanto as propriedades da solução como os parâmetros de processamento e parâmetros ambientais são determinantes para as características das fibras eletrofiadas [72].

Parâmetros das soluções poliméricas

Esta classe de parâmetros engloba a viscosidade, tensão superficial e condutividade da solução a eletrofiar, características que dependem da massa molecular, concentração e especificidade do sistema polímero-solvente eleito.

Para que exista formação de fibras é necessária uma concentração mínima de polímero na solução. Quando a concentração é demasiado baixa é obtida uma mistura de fibras e contas que, à medida que a concentração aumenta, tendem a converter-se em fibras uniformes. A concentrações demasiado altas é impossível a formação de fibras contínuas. Soluções poliméricas de um políme-

ro de elevado peso molecular podem possuir uma viscosidade adequada à formação de nanofibras, sendo que o diâmetro destas aumenta com o aumento do peso molecular. Já se o peso molecular for reduzido há tendência para a formação de contas [37]. A viscosidade resulta do ajuste destes dois parâmetros: concentração e peso molecular. Se demasiado baixa, a elevada tensão de superfície leva à quebra do jato e consequente formação de fibras com contas, existindo *electrospraying* ao invés de eletrofiação. O aumento gradual da viscosidade determinará a obtenção de fibras de maior diâmetro graças ao aumento da resistência das forças viscoelásticas ao estiramento. A evaporação do solvente determina um aumento da viscosidade do fio polimérico, o que faz com que o estiramento seja cada vez menor [72].

A tensão superficial entre meios líquido e gasoso resulta da maior força coesiva de atração entre moléculas de um líquido comparativamente à força de atração entre moléculas no ar. Esta tensão traduz-se na minimização da razão área/volume. Soluções com tensões superficiais muito elevadas conduzem à eletrofiação de fibras com contas [73].

Quando eletrofiadas, soluções mais condutoras originam jatos com uma maior densidade de carga. Assim, um aumento da condutividade implica um aumento das forças de repulsão eletrostática e, portanto, um maior estiramento, diminuindo o diâmetro das fibras [74][75]. No entanto, durante o voo, a evaporação do solvente aumenta a viscosidade da fibra, o que significa que o estiramento a que a fibra está sujeita diminui à medida que a fibra se aproxima do coletor.

Parâmetros de produção

Nos parâmetros de produção destacam-se a voltagem aplicada à agulha, a distância entre esta e o coletor, o caudal da solução a eletrofiar, o diâmetro interno da agulha e o tipo de coletor.

A voltagem aplicada afeta diretamente a quantidade de carga que passa pela solução polimérica e o tempo de voo da nanofibra desde a ponta da agulha até ao coletor. O aumento na tensão aplicada pode traduzir-se quer num aumento quer numa diminuição do diâmetro das fibras. O menor estiramento do jato advém de uma diminuição do tempo de voo, devido ao aumento da aceleração do fio em direção ao coletor [72][76]. Mas um aumento da voltagem implica também um aumento das forças eletrostáticas de repulsão, favorecendo a diminuição do diâmetro das fibras, graças ao maior estiramento [37][77].

O aumento da distância agulha-coletor determina a diminuição da intensidade do campo elétrico a que as fibras se encontram sujeitas e consequentemente aumenta o tempo de voo. O aumento do tempo de voo leva, até certo ponto, a um aumento do estiramento, o que origina fibras mais finas. No entanto, a maior evaporação do solvente que decorre do maior tempo de voo faz aumentar as forças viscoelásticas e contraria o estiramento, sendo possível que se observe aumento do diâmetro das fibras com o aumento da distância agulha-coletor [72].

Um aumento do caudal ou do diâmetro da agulha favorecem um aumento do diâmetro das fibras, devido ao aumento da quantidade de solução por unidade de tempo, dando menos tempo para a evaporação do solvente [37].

De acordo com o tipo de coletor utilizado é possível obter fibras distintas; sejam elas depositadas num coletor plano e, por isso, desalinhadas, ou sejam elas depositadas num coletor cilíndrico rotatório e, por isso, alinhadas preferencialmente na direção circunferencial do coletor. O alinhamento das fibras pode ser determinado pelo tipo de coletor, o seu diâmetro e a sua velocidade rotacional [37].

Parâmetros ambientais

A temperatura e a humidade relativa são parâmetros que podem afetar tanto o diâmetro como a morfologia das fibras produzidas.

Como a concentração da solução polimérica é fixa, um aumento da temperatura ambiente resulta na expansão das moléculas do polímero e num aumento da taxa de evaporação do solvente. Ainda que a evaporação do solvente dite um aumento da viscosidade, esta expansão das moléculas traduz-se numa diminuição da viscosidade e consequente diminuição das forças viscoelásticas. Ao diminuir a resistência à força Coulombiana de atração, existe um maior estiramento e, daí, menor diâmetro das fibras eletrofiadas [78].

O efeito da humidade relativa do ar no diâmetro e morfologia das fibras resulta da interação entre o jato e o vapor de água presente na atmosfera. Uma baixa humidade poderá aumentar a velocidade da evaporação de solvente, resultando na sua total evaporação. Já uma elevada humidade poderá conduzir ao aumento do diâmetro das fibras devido à neutralização das cargas no jato (e consequente diminuição das forças de estiramento) e favorecer a formação de irregularidades na superfície fibrosa [79].

2.2.1 Montagem experimental do sistema de eletrofiação

Na figura 2.7 é apresentada a montagem utilizada para a produção das matrizes de fibras alinhadas de CS e CS/PEDOT. Nesta montagem a bomba injetora (New Era Pump Systems) encontra-se a uma distância ajustável de um coletor cilíndrico com cerca de 8 cm de diâmetro e 21 cm de comprimento acoplado a um sistema que permite a movimentação translacional e rotacional do coletor, com velocidades controladas para cada movimentação. Para a produção das fibras alinhadas apenas se utilizou a movimentação rotacional do coletor. A velocidade máxima do movimento de rotação é de cerca de 4000 rpm. Velocidades diferentes de rotação permitem obter matrizes de fibras com diferentes graus de alinhamento, sendo que este depende da solução polimérica que se eletrofia.

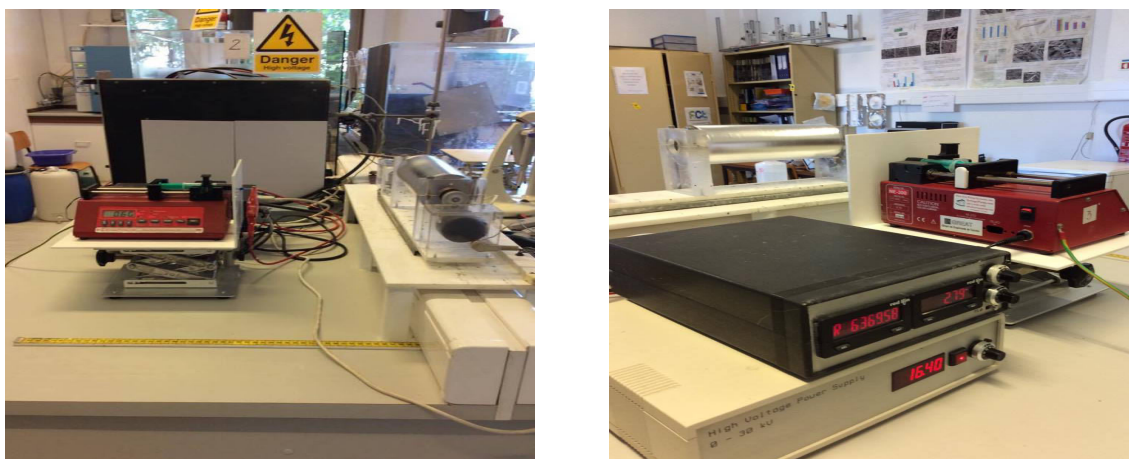


Figura 2.7 - Montagem horizontal do sistema de eletrofiação no coletor cilíndrico (vistas distintas do sistema).

Neste sistema foram eletrofiadas soluções de CS e de misturas de CS com o híbrido CS/PEDOT. A eletrofiação das soluções de CS teve, por base, certos parâmetros de eletrofiação já testados com sucesso no GREAT [80]. No entanto, a eletrofiação das soluções contendo o híbrido CS/PEDOT requereu o ajuste destes parâmetros.

2.2.2 Soluções para eletrofiação

Neste trabalho, na ausência de outra explicitação, as concentrações das soluções referem-se às percentagens em massa dos constituintes para a massa total de solução. Noutro caso, será indicado o seu significado.

Na tabela 2.2 apresentam-se os polímeros, solventes e sais utilizados na preparação das soluções.

Tabela 2.2 - Polímeros, solventes e sais utilizados na síntese das soluções poliméricas.

Material	Fórmula molecular	Peso molecular (g/mol)	Fornecedor
CS	$(C_8H_{13}O_5N)_{0,245n}(C_6H_{11}O_4N)_{0,755n}$	500 000	Cognis S
Ácido acético	CH_3COOH	60,05	Carlo Erba Reagents
PEO	$(CH_2CH_2O)_n$	2 000 000	Sigma-Aldrich
EDOT	$C_6H_6O_2S$	142,18	Sigma-Aldrich
Cloreto de ferro (III) Hexahidratado	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	270,3	Alfa Aesar
APS	$(NH_4)_2S_2O_8$	228,2	Sigma-Aldrich
Etanol	C_2H_5OH	46,06	AppliChem GmbH
Hidróxido de sódio	NaOH	40	EKA Chemicals

Preparação do híbrido CS/PEDOT

A preparação do híbrido de CS/ PEDOT iniciou-se com testes às concentrações de CS e ácido acético (AcAc) (mantendo o EDOT a 1,8%), para cada solução oxidante: $FeCl_3$ 50% (v/v) em ETOH (etanol), $FeCl_3$ 50% (v/v) em H_2O e APS 50% (v/v) em H_2O .

No total, testaram-se 18 soluções, 6 condições para cada uma das 3 soluções oxidantes, são elas:

- 1,8% CS, 1,8% EDOT em AcAc 2%;

- 3,6% CS, 1,8% EDOT em AcAc 2%;
- 1,8% CS, 1,8% EDOT em AcAc 90%;
- 3,6% CS, 1,8% EDOT em AcAc 90%;
- 1,8% CS, 1,8% EDOT em AcAc 45%;
- 3,6% CS, 1,8% EDOT em AcAc 45%;

Assim se compreendeu a influência da quantidade de água na reação de polimerização, sendo que em AcAc a 2%, por mais tempo que passasse, a solução não atingia uma cor mais escura que o verde escuro, indicando reduzida polimerização. Já com AcAc a 90% era perceptível a floculação quase instantânea do quitosano com o FeCl_3 , verificando-se a formação, em alguns minutos, de um aglomerado solidificado muito rígido de cor azul escura, típica do PEDOT [36]. Pelo que se conclui que a existência de água condiciona a polimerização do EDOT com o quitosano, hipoteticamente, porque a reação da água (presente no ácido) e do próprio EDOT com o FeCl_3 origina HCl que, dissociado, protona os grupos amina do CS, num ambiente razoavelmente ácido. Assim, concluiu-se que, para a reação de polimerização, se pode recorrer a um ácido medianamente concentrado.

Como já foi referido, o meio ácido propicia a reação de polimerização e a presença de água obriga a uma separação de fases entre o EDOT e o solvente, dificultando a reação, pelo que, com AcAc a 45% foi possível obter uma solução de PEDOT de cor azul escura nítida e processável através da precipitação do híbrido, da sua lavagem e redissolução em AcAc.

Foram então produzidas quatro soluções iguais de CS a 3,6% dissolvido em ácido acético 45% (v/v) em H_2O , às quais foi adicionado EDOT a 1,8% e PEO a 0,4%. A cada uma destas soluções adicionou-se de forma distinta o oxidante. Para a polimerização do EDOT utilizaram-se quatro soluções oxidantes distintas: FeCl_3 50% (v/v) em ETOH (etanol), FeCl_3 50% (v/v) em H_2O , APS 50% (v/v) em H_2O e uma mistura de APS 50% (v/v) em H_2O e FeCl_3 50% (v/v) em H_2O .

Os oxidantes foram adicionados a cada uma das soluções por infusão com duas bombas injetoras (KdScientific 100 e Chemyx Inc. Fusion 100 Classic). A infusão decorreu durante 2 horas para cada solução e, em seguida, as soluções

foram mantidas na estufa a 37° C (JP Selecta Incudigit), em agitação a 500 rpm, durante 15 dias.

Foram preparadas quatro soluções como na alínea 1) e uma de cada das alíneas seguintes.

- 1) Solução antes da adição de FeCl₃/ APS:
 Massa de CS: 0,18 g
 Massa de AA 45% (v/v): 4,71 g
 Massa de PEO: 0,02 g
 Massa EDOT: 0,09 g
- 2) Preparação da solução de FeCl₃ em etanol:
 Massa de FeCl₃.6H₂O: 0,2 g
 Massa de etanol: 0,2 g
- 3) Preparação da solução de FeCl₃ em água:
 Massa de FeCl₃.6H₂O: 0,2 g
 Massa de etanol: 0,2 g
- 4) Preparação da solução de APS em água:
 Massa de APS: 0,2 g
 Massa de água: 0,2 g
- 5) Preparação da solução de FeCl₃ e APS em água:
 Massa de FeCl₃.6H₂O: 0,1 g
 Massa de APS: 0,1 g
 Massa de água: 0,2 g

Adicionou-se cada uma das soluções de oxidante (2), 3), 4) e 5)) a cada uma das quatro soluções de quitosano (1)), nos respetivos volumes: 0,094 ml (FeCl₃ etanol), 0,094 ml (FeCl₃ água), 0,073 ml (APS) e 0,079 ml (APS e FeCl₃). O número de moles de EDOT manteve-se fixo para as quatro soluções de CS: 0,000633 moles.

Em seguida, na tabela 2.3, apresentam-se as concentrações molares para cada condição de oxidação e a proporção molar EDOT: oxidante utilizada neste trabalho.

Tabela 2.3 - Proporção molar EDOT: oxidante utilizada para cada solução. A média das proporções é de 3,03:1.

	n (moles)	Proporção EDOT: oxidante
FeCl ₃ 50% (v/v) em etanol	0,00019140	3,30:1

FeCl ₃ 50% (v/v) em água	0,00022443	2,82::1
APS 50% (v/v) em água	0,00021256	2,98:1
APS e FeCl ₃ 50% (v/v) em água	0,00020903	3,03:1

Após 15 dias, as quatro soluções adquiriram uma cor azul escura, evidência macroscópica da polimerização do EDOT em PEDOT (vide figura 2.8). Para a precipitação do híbrido CS/PEDOT, dado que o CS precipita em ambiente básico, calculou-se o número de moles de AcAc associado a 4,71 g de AcAc 45% (v/v) através das massas molares do ácido acético glacial e da água. Em 4,71 g de AcAc 45% (v/v) existem, portanto, 0,13 moles de ácido que correspondem a 26 ml de NaOH a 5M. Em seguida, a cada solução foi adicionada água destilada até perfazer 40 ml e estas foram colocadas a centrifugar a 2600 rpm por 10 minutos na centrífuga (Centurion Scientific K3 Series), este processo de lavagem foi repetido 10 vezes para cada solução.

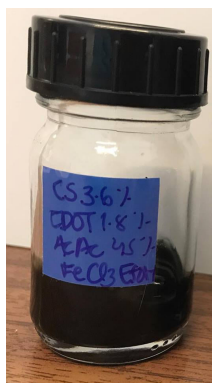


Figura 2.8 – Exemplo da solução obtida por oxidação com FeCl₃ em etanol, após polimerização do EDOT em PEDOT, conjuntamente com CS 3,6%.

O precipitado, depois de lavado, foi deixado a secar na estufa a 37°C durante 24 horas. Assim, foi possível obter quatro precipitados de CS/PEDOT para cada condição de oxidação, como é observável na figura 2.9. A partir destes precipitados, denominados de *pellets*, foram produzidas as soluções a eletrofiar.



Figura 2.9 – Exemplo do precipitado de CS/ PEDOT obtida por oxidação do EDOT com APS, depois de seco.

Preparação das soluções a eletrofiar

Os precipitados foram dissolvidos em soluções em ácido acético a 90% (v/v) em H₂O com a seguinte composição: 1,8% do híbrido CS/PEDOT em consideração, 1,8% de CS e 1,2% de PEO (ver figura 2.10).

- 1) Massa total das *pellets* de PEDOT obtidas:
Cloreto de ferro em etanol: 0,310 g
Cloreto de ferro em água: 0,267 g
APS em água: 0,282 g
Cloreto de Ferro e APS em água: 0,196 g
- 2) Para soluções de massa total de 10 g, adicionaram-se, em quatro frascos:
Massa de AA 90%: 9,52 g
Massa CS: 0,18 g
Massa de (cada) *pellet*: 0,18 g
Massa de PEO: 0,12 g

O PEO e CS foram adicionados por forma a conseguir eletrofiar a solução sem que ocorresse *electrospray* (fenómeno que se dá, neste caso, quando a concentração de PEO não é suficiente para promover o entrelaçamento de cadeias poliméricas, existindo gotejamento). Na figura 2.10 é possível observar um exemplo de uma solução de CS/ PEDOT após redissolução. As soluções foram deixadas em agitação magnética por 15 horas à temperatura ambiente, ao fim das quais se iniciou a eletrofiação. As soluções foram usadas num período de 48 horas após a sua produção, para evitar efeitos de envelhecimento (degradação do CS).

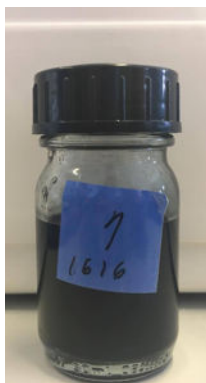


Figura 2.10 - Exemplo da solução obtida após a redissolução do híbrido de CS/ PEDOT sintetizado por oxidação com FeCl_3 em etanol.

A utilização de uma solução aquosa de ácido acético concentrado e a adição de PEO permitiram ultrapassar algumas dificuldades na eletrofição de soluções. A tensão superficial e a elevada condutividade das soluções de CS (uma vez que o CS é um polímero policationico) levantam dificuldades à sua eletrofição. Também a força repulsiva entre grupos iónicos da cadeia polimérica dificultam a formação de fibras. A utilização de AA a 90% permite diminuir a tensão superficial das soluções e a adição de PEO estabiliza o processo de eletrofição, permitindo obter fibras uniformes. Este efeito é atribuído ao estabelecimento de fortes ligações por pontes de hidrogénio entre os grupos hidroxilo e amina do CS e os grupos éter do PEO [75]. O aumento da concentração de PEO face à concentração de CS conduz à diminuição da condutividade da solução, uma vez que o PEO é uma molécula neutra, e a sua adição resulta na redução da protonação das aminas do CS que se ligarão aos grupos éter do PEO [75], como é observável na figura 2.11.

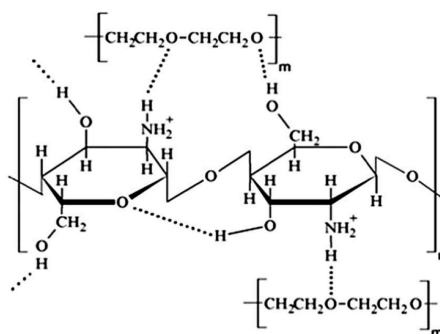


Figura 2.11 - Exemplificação das ligações de hidrogénio entre as moléculas de quitosano e PEO (adaptado[75]).

Também foram produzidas duas soluções de controlo de CS: uma de CS a 1,8% em ácido acético a 90% (v/v) e PEO a 0,4% para eletrofiação de nanofibras alinhadas em coletor cilíndrico a 2200 rpm e outra de CS a 4% em ácido acético a 2% (v/v) com PEO a 0,4%, para a produção de filmes, de que se falará no subcapítulo 2.2.3.

2.2.3 Produção de filmes e matrizes de fibras

No processo de eletrofiação das soluções CS/ PEDOT produzidas após redissolução, foram testados diversos parâmetros de eletrofiação, a 4000 rpm, para verificar e conseguir sintetizar os seus efeitos na morfologia das fibras. Partiu-se de um conjunto de parâmetros já testado com sucesso para eletrofiação de fibras de CS a 1,8% [80], no GREAT e procedeu-se à sua variação. A observação do aspeto das deposições permitiu concluir sobre a influência dos parâmetros de produção na morfologia das fibras, com os devidos ajustes para as deposições com soluções condutoras.

Com recurso a uma seringa de 5 ml e uma agulha de 23 G, a uma distância de 20 cm do coletor cilíndrico, eletrofiaram-se cada uma das soluções com um caudal de 0,6 ml/h e uma tensão aplicada de 16 kV, a 2200 rpm por 6 horas, para formação das matrizes.

Para observação das fibras recorreu-se aos microscópios óticos VWR VisiScope e Nikon Eclipse LV100 (vide figura 2.12). Com o primeiro foi possível observar fibras alinhadas fixas sobre lamelas de vidro, quadradas, de 12 mm e com o segundo, maiores ampliações e fibras depositadas em folhas de alumínio, usadas para forrar o coletor cilíndrico. No programa IS VisiCam Image Analyser foi possível medir uma média de quatro valores de diâmetro para cada condição de oxidação, por forma a ter-se uma noção da variação do diâmetro das nanofibras obtidas sob as mesmas condições, mediante o tipo de oxidante utilizado.

A fixação das fibras em lamelas de vidro foi efetuada de duas maneiras. Uma abordagem consistia na deposição direta nas lamelas quadradas de 12 mm presas com fita-cola de dupla face na zona central da folha de alumínio que recobria o coletor. Outra abordagem consistiu na colocação de lamelas circulares de 10 mm de diâmetro sobre a deposição e, em volta das mesmas, colocar, com o auxílio de uma seringa e agulha, um fio de solução de PCL 10% em clorofórmio. Após a evaporação do solvente, o fio deu origem a um filme capaz de fixar as fibras alinhadas aos rebordos da lamela.



Figura 2.12 - Microscópios óticos utilizados na análise da morfologia das nanofibra. À esquerda VWR VisiScope e à direita Nikon Eclipse LV100 (adaptado [80]).

A partir da solução controlo de CS referida em 2.2 e das quatro soluções de CS/ PEDOT a 1,8% CS, foram produzidos filmes. Assim, é possível comparar a condutividade associada à presença do polímero condutor nos filmes de quitosano e nas fibras. Foram colocados 5 ml de cada solução em caixas de Petri de plástico e as amostras foram deixadas a evaporar na estufa a 37° C, durante 48 horas.

Como a dissolução do CS depende da protonação dos grupos amina, exige que se faça em soluções aquosas ácidas. Assim, existem resíduos de ácido nos filmes/ fibras que podem comprometer a viabilidade celular. Para eliminar este potencial risco de citotoxicidade, os filmes foram deixados por 48 horas dentro de um exsicador conectado a uma bomba de vácuo, de forma a remover resíduos de solvente (vide figura 2.13). E, em seguida, foram colocados por 69 horas na estufa a 80° C, de maneira a evaporar todo o ácido acético.



Figura 2.13 - Filmes de quitosano e PEDOT no exsicador acoplado à bomba de vácuo.

2.3 Medição da condutividade

No Departamento de Ciências dos Materiais, foi possível medir a condutividade dos materiais através da ligação de uma fonte de tensão/amperímetro Keithley Tektronix (vide figura 2.14) a duas pontas de prova condutoras.

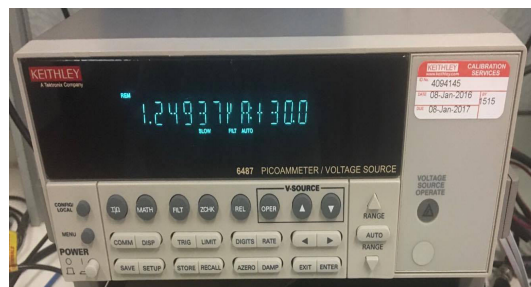


Figura 2.14 - - Fonte de tensão/amperímetro Keithley Tektronix 6487.

De acordo com a Lei de Ohm, o declive da regressão linear de melhor aproximação aos dados experimentais de corrente que percorre a amostra em função da tensão que lhe é aplicada, corresponde ao inverso da sua resistência, R .

$$V = RI \Leftrightarrow I = \frac{1}{R} V$$

No caso de um filme condutor, admitindo uma secção eficaz uniforme e uma corrente elétrica também uniforme que a percorra, a resistividade elétrica ρ , é dada por:

$$\sigma = \frac{1}{R} \times \frac{\ell}{A}$$

O valor de $\frac{1}{R}$, inverso da resistência elétrica, na expressão anterior, pode ser calculado pelo declive da reta $I(V)$, acima referida, os valores de ℓ , e e d podem ser obtidos por medição direta, como se pode constatar pela figura 2.15. A condutividade elétrica é uma característica do material do filme.

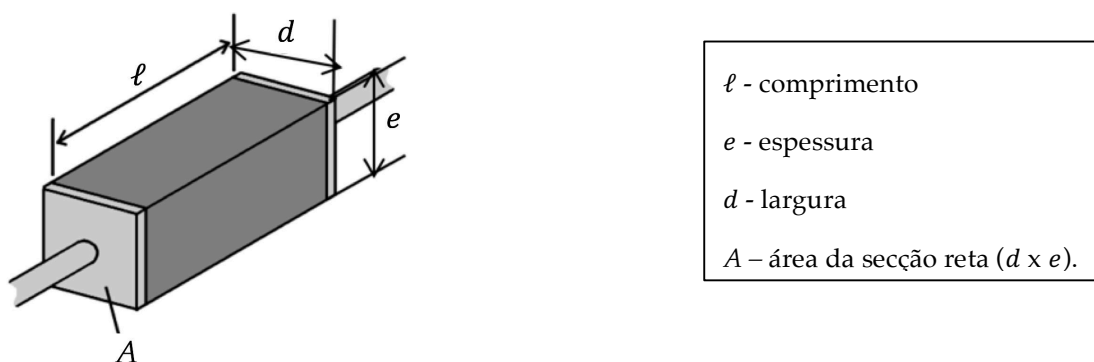


Figura 2.15 - Imagem esquemática da porção de filme a testar, em que A resultará da multiplicação da largura do crocodilo que fornece a voltagem pela espessura do filme ($A = d \times e$); (adaptado de Wikimedia Commons).

As espessuras, tanto dos filmes como das matrizes de nanofibras que foram usados para determinar a condutividade, foram medidas com o auxílio de um micrómetro (Mitutoyo Absolute Digimatic). Para cada amostra, a espessura foi medida lamelas de vidro de forma a minimizar a pressão aplicada. Para cada amostra foram realizadas medições da espessura em três pontos e calculada a respetiva média, a ser utilizada nos cálculos da condutividade. A massa das amostras foi medida na balança (Precisa XR205SM-DR).

2.4 Avaliação da condutividade dos filmes de CS/PEDOT

A medição da condutividade dos filmes de CS/PEDOT foi primeiramente levada a cabo através da utilização de fita de carbono (vide figura 2.16).

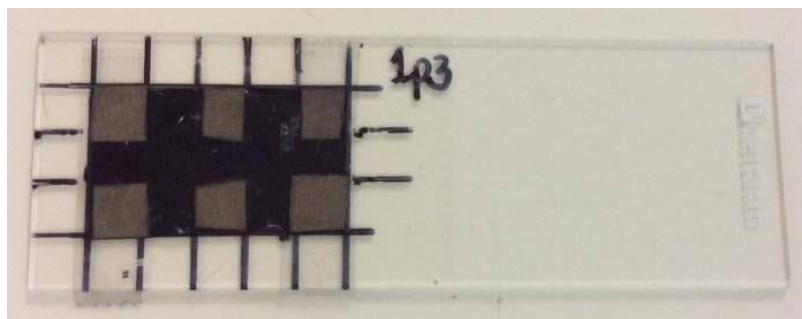


Figura 2.16 - Exemplificação da medição da condutividade do filme CS/PEDOT (oxidação com FeCl_3 50% (v/v) em ETOH) com fita de carbono.

No entanto, a condutividade dos filmes de CS/PEDOT medida com a fita revelou valores irregulares e baixos o que sugeriu um mau contacto entre as amostras e os elétrodos. Optou-se por uma nova montagem em que se recorreu a dois crocodilos sem dentes, i.e., a superfície de contacto com a amostra é uma superfície plana (ver figura 2.17). Para este caso, os valores já se apresentavam regulares e cerca de 4 casas decimais superiores. Foram efetuadas medições para dois comprimentos diferentes de cada filme e para os diferentes filmes produzidos com os vários híbridos CS/PEDOT (obtidos recorrendo a diferentes soluções oxidantes).

Com o objetivo de uniformizar as medições, fixando a distância entre elétrodos e largura das amostras sem que estas sofressem deformação, foi utilizada uma máscara de papel. O papel contém cerca de 90 a 99% de fibras de celulose, que é um bom isolante. Foram levadas a cabo medições com e sem papel, que comprovaram que o papel que se estava a utilizar não afetava a intensidade de corrente medida.



Figura 2.17 - Montagem experimental utilizada para medição da condutividade dos filmes de CS/ PEDOT, com recurso a uma máscara de papel. A distância entre os dois crocodilos é de 0,5 cm, mantendo-se constante para todas as amostras.

Na figura 2.18, que se segue, são apresentadas as dimensões da máscara e do filme de CS/ PEDOT. A máscara utilizada foi sempre a mesma, com as dimensões abaixo exemplificadas. Para os filmes, que inicialmente tinham a forma de quadrados com 10 mm de lado, verificou-se a alteração nos valores de condutividade associada à redução das dimensões, para as abaixo exemplificadas.

Para efeitos estatísticos, de cada uma das quatro condições de oxidação foram produzidos dois filmes, lote 1 e lote 2, aos quais seria feito o estudo da condutividade.

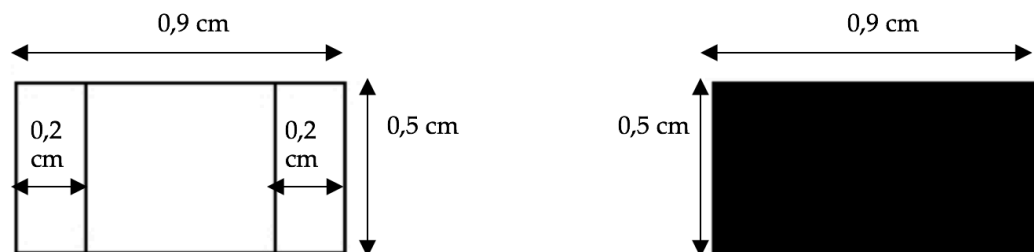


Figura 2.18 - Imagem esquemática das dimensões da máscara de papel (esquerda) e do filme de CS/PEDOT (direita) utilizados na medição das condutividades. Os 0,2 cm correspondem à largura dos crocodilos, mantendo-se assim 0,5 cm fixos entre eles.

2.5 Medição da condutividade das fibras de CS/PEDOT

Para efeitos estatísticos relativos à medição da condutividade, foram eletrofiados dois conjuntos de amostras de nanofibras correspondentes a cada uma das quatro soluções, sob as mesmas condições.

Devido à fragilidade das matrizes de nanofibras, foi necessário procurar outras alternativas à utilização direta de crocodilos. Foram feitos ensaios com fita de carbono e cola de prata, mas as medições efetuadas revelaram condutividades muito baixas comparativamente com os valores obtidos para os filmes, chegando mesmo a obter-se ausência total de condutividade.

A preparação das fibras consistiu na colocação de 2 tiras de fita-cola de dupla face numa lâmina distando 5 mm entre si. Assim, seguraram-se as matrizes à lâmina. Na matriz, aplicou-se pasta de prata, mantendo os 5 mm delineados na lâmina.

Para a medição da condutividade das nanofibras utilizou-se pasta de prata, de forma a penetrar na estrutura e maximizar os valores de condutividade. Após colocação, a pasta de prata foi sujeita a um processo de cura a 100° C por 1 hora num forno Nabertherm B180. Para se conseguir utilizar os crocodilos nas fibras, e obter valores significativos de condutividade, recorreu-se a um elétrodo de níquel colocado entre a camada de pasta de prata e os crocodilos. Estes elétrodos não só impediram que a viscosidade da pasta interferisse com a medi-

ção como facilitaram a introdução dos crocodilos de acordo com as medidas anteriormente efetuadas com os filmes, como se encontra exemplificado na figura 2.19.

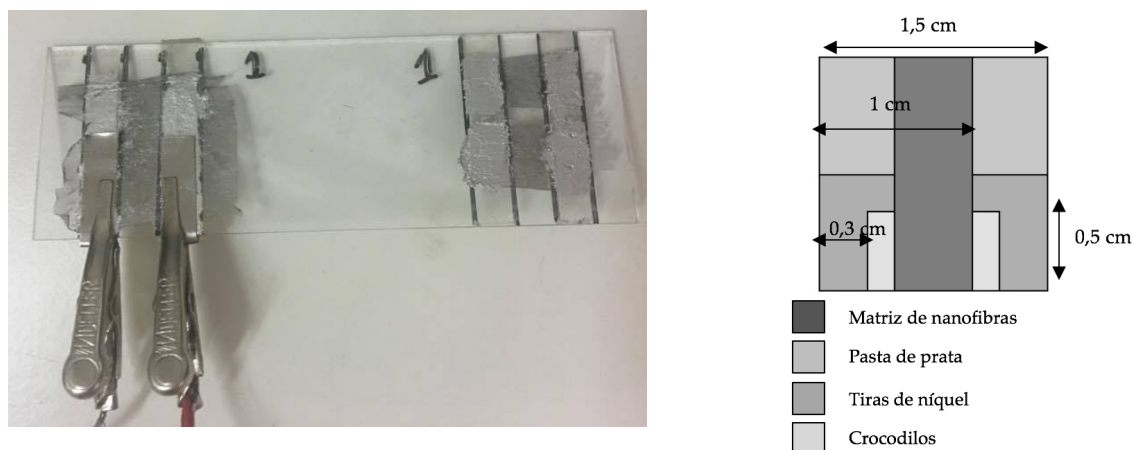


Figura 2.19 - Montagem experimental utilizada na medição da condutividade das matrizes de nanofibras de CS/PEDOT e respetiva imagem esquemática com as dimensões associadas.

2.6 Análise química da solução de PEDOT

Numa tentativa de detetar por UV-vis polarões que poderão resultar, ao longo do tempo, da reação de polimerização do EDOT por oxidação com FeCl_3 em vários ambientes, recorreu-se a um espectrofotómetro ScanSpec da ScanSci (figura 2.20).

Vários estudos admitem que, para a polimerização de PEDOT dopado (com condutividades entre 0,02 e 0,40 S/cm), a proporção adequada é de 2,33:1 oxidante: EDOT, considerado excesso estequiométrico se superior a 1:1. Quanto mais baixo este rácio, menor a dopagem, menor a condutividade e mais (próximo de) neutro é o PEDOT produzido [11] [36] [81] [82].

O estado neutro do PEDOT é geralmente observado na região do visível, entre os 400 e os 600 nm, enquanto que os estados química ou eletricamente dopados podem ser observados na região entre os 800 e os 1800 nm (polarão e bipolarão, respetivamente). O pico de absorção do polarão é observável na região de comprimentos de onda entre os 600 e os 900 nm [47].

Prepararam-se soluções em que se manteve a proporção de EDOT/ FeCl_3 1:1 molar, com vista à produção de PEDOT pouco dopado.



Figura 2.20 - Espectrofotômetro ScanSpec utilizado para observação do espectro UV-vis dos solventes envolvidos na reação de polimerização do EDOT.

A figura 2.21 apresenta as soluções preparadas, mediante dissolução do EDOT em vários solventes e a utilização de várias soluções oxidantes, e o seu aspeto 2 horas após a mistura destas soluções. Os espectros foram recolhidos 24 horas após essa mistura. Como já foi referido, na impossibilidade de se utilizar ácido acético glacial na polimerização do EDOT, devido à solidificação do CS em contacto com o FeCl_3 . O compromisso entre o valor de água mínimo necessário à dissolução do quitosano e dispersão moderada do EDOT e máximo que permitisse a polimerização, foi feito por concentrações moderadas de ácido acético. Que, como é visível na solução número 4 (sistema utilizado na polimerização com o CS), não inviabilizou a polimerização do EDOT.

	EDOT 1,8%	EDOT 0%
2 ml de H_2O + FeCl_3 50% (v/v) em 2ml de H_2O - 1		
2 ml de ETOH + FeCl_3 50% (v/v) em 2ml de ETOH - 2		
2 ml de AcAc glacial + FeCl_3 50% (v/v) em 2ml de AcAc glacial - 3		
2 ml de AcAc 45% + FeCl_3 50% (v/v) em 2ml de ETOH - 4		

Figura 2.21 - Polimerização do EDOT com FeCl_3 para cada conjunto de solventes.

2.7 Análise química dos filmes – FTIR

A Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier com modo de refletância total atenuada (ATR-FTIR, do inglês *Attenuated Total Reflectance Fourier Transform Infrared Spectroscopy*) permitiu avaliar as ligações químicas (grupos funcionais) dos filmes de CS/PEDOT, para as diferentes condições de polimerização. Utilizou-se um espectrofotómetro (Thermo Scientific Nicolet 6700 FTIR), para se obter o espectro vibracional de cada amostra. O facto de as ligações moleculares possuírem frequências de vibração distintas, permite localizar nos espectros determinados picos que surgem em locais específicos.

Foram analisados um filme controlo de CS e filmes nas quatro condições de oxidação estudadas, para posterior comparação.

2.8 Cultura celular

As culturas celulares permitem uma primeira avaliação da biocompatibilidade dos *scaffolds* sintetizados no que concerne à citotoxicidade e à adesão, proliferação e morfologia de células semeadas nos *scaffolds*. Os testes *in vivo* só são possíveis após indicações de biocompatibilidade fornecidas por testes *in vitro*.

Para a cultura celular podem ser utilizadas culturas primárias, provenientes de isolamentos celulares de tecido vivo, ou linhas celulares, de um tipo celular único. As linhas celulares apresentam várias vantagens sobre as culturas primárias, ainda que estas sejam ferramentas biologicamente mais relevantes no estudo da biologia humana e animal. A sua facilidade de obtenção e a capacidade de proliferar quase indefinidamente de algumas linhas celulares, e principalmente a reprodutibilidade que garantem aos resultados apurados, fizeram com que as linhas celulares sejam usadas como abordagem de custo-efetividade em pesquisa.

A capacidade de proliferação das linhas celulares e o facto de serem virtualmente imortais advém do facto de se tratarem de células da linha germinativa tumoral. Linhas não tumorais suportam, no entanto, um número elevado de divisões celulares (cerca de 50, dependendo da linha em questão) e podem ser

transformadas em células imortais pela administração de oncogenes virais ou tratamentos químicos [83]. A passagem em série de linhas celulares pode resultar em discrepâncias fenotípicas, no entanto, a autenticação de um estudo com linhas celulares é o limiar para a concessão de bolsas, dado que são razoavelmente estáveis e mantêm o seu fenótipo após várias passagens. Os constituintes básicos dos meios incluem nutrientes (sais inorgânicos, glícidos, aminoácidos, vitaminas, ácidos gordos e lípidos, proteínas e péptidos) e água (sérum).

Durante o processo de cultura celular é indispensável assegurar a esterilidade dos materiais utilizados e do ambiente laboratorial. Para tal, todos os procedimentos que englobam a cultura foram realizados dentro da câmara de segurança microbiológica (Esco Labculture® Class II).

Pellets do híbrido CS/PEDOT, foram sujeitas a um teste de citotoxicidade pelo método de extrato, de acordo com a norma ISO 10993-5. Para a produção dos extratos, foram utilizados somente três dos quatro tipos de precipitados de CS/PEDOT obtidos. Nomeadamente, os obtidos usando como soluções oxidantes, FeCl₃ em ETOH, em água e APS. Estes precipitados foram esterilizados com etanol 70% (v/v), seguindo o protocolo que se encontra no apêndice A, antes de produzir os extratos. Para a produção dos extratos, foi usada uma parte da massa total de cada tipo de *pellet* e colocada em meio de cultura numa razão de 20 mg para 1 ml de meio.

A cultura celular usada no teste foi realizada com células pertencentes à linha celular aderente Vero, obtida de células epiteliais de rim de macaco. Esta encontrava-se em cultura num frasco T25 (25 cm² de área) em meio de proliferação constituído por DMEM (do inglês, *Dulbecco's Modified Eagle Medium*), D-glucose (Gibco), bicarbonato de sódio (Sigma-Aldrich) suplementado com 10% de FBS (do inglês, *Fetal Bovine Serum*) (Invitrogen), com 1% de GlutaMAX™ (Life Technologies), com 1% de piruvato de sódio (Life Technologies) e 1% de antibiótico penicilina-estreptomicina (Invitrogen). As células proliferaram neste meio até atingirem um estado de confluência de cerca de 70%.

Para proceder à cultura em poços de uma caixa de 96 poços, as células no T25 foram tripsinizadas e postas em suspensão de acordo com o protocolo de tripsinização apresentado no Apêndice B. A tripsina é uma enzima proteolítica capaz de clivar as ligações entre os aminoácidos das proteínas intercelulares responsáveis pela adesão das células ao fundo do frasco, deixando-as em suspensão.

Em seguida, procedeu-se à contagem das células seguindo o protocolo de contagem celular presente no Apêndice C. Após este procedimento, realizaram-se os cálculos e procedimentos necessário à sementeira na densidade pretendida (entre 12 000 e 10 000 células por poço de 0,32 cm²). Concluída a sementeira, as células foram colocadas na incubadora (Sanyo MCO19AIC(UV)), à temperatura de 37° C e numa atmosfera de 5% de CO₂, onde permaneceram 24h antes da colocação dos extratos

Testaram-se três condições de incubação com os extratos nas concentrações, 20%, 10% e 5% (m/v) por diluição a partir da maior concentração. Usaram-se para cada uma destas concentrações cinco réplicas. Para além das réplicas é necessário fazer também o controlo de células semeadas em condição-padrão (aderidas ao fundo do poço da placa de cultura) e controlos, positivo e negativo, de meio (referência das leituras de absorvância). O período de incubação das células em meio modificado foi de 24 horas, ao fim das quais se iniciou o teste de viabilidade.

2.8.1 Avaliação da viabilidade celular

Para a realização do teste, determinou-se a viabilidade celular em cada condição testada recorrendo a uma solução de resazurina a 0,2 mg/ml. A resazurina é um corante azul não fluorescente, sensível à luz, que é passível de ser processado metabolicamente pelas células quando estas se encontram viáveis. A redução da resazurina a resorufina, cor-de-rosa e altamente fluorescente, é um método capaz de quantificar e estabelecer a viabilidade relativa das células em meio condicionado. Assim, as alterações da cor do meio podem ser avaliadas através das medições ou de fluorescência ou de absorvância. Neste trabalho, realizaram-se leituras de absorvância nos comprimentos de onda de 570 e 600 nm, para os quais a absorção da resorufina e da resazurina são máximas, respetivamente (figura 2.22).

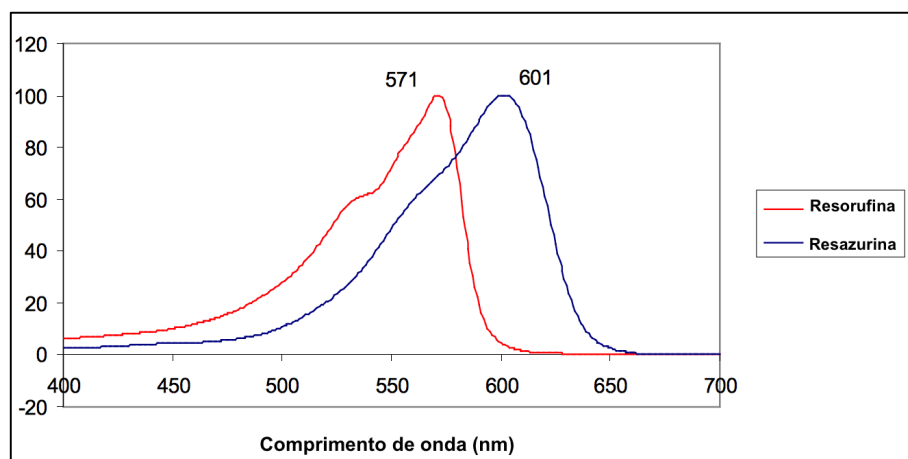


Figura 2.22 - Espectros de absorvância da resorufina e da resazurina (adaptado [89]).

Ao meio de cultura adicionou-se a solução de resazurina a 10% (v/v). O teste foi efetuado numa placa de 96 poços (0,32 cm² cada poço), tendo sido utilizados 59 poços, cada um com 120 µl de meio com resazurina. O período de incubação foi de 3 horas, ao fim das quais se fez a leitura da absorvância.

Para observação das células semeadas na placa e, posteriormente, nos testes de substrato, recorreu-se ao microscópio de epifluorescência (Nikon Eclipse Ti-S) e as leituras foram levadas a cabo num leitor de placas (Biotek ELx800 UV) (figura 2.23).

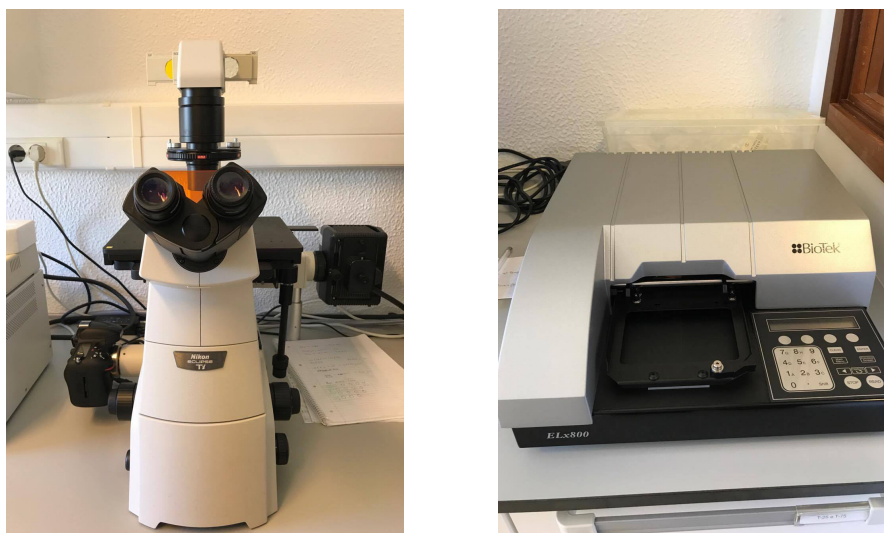


Figura 2.23 – Conjunto microscópio de epifluorescência Nikon Eclipse Ti-S (à esquerda) e leitor de placas Biotek ELx 800 UV (à direita).

3 Apresentação, Análise e Discussão de Resultados

3.1 Produção e análise morfológica das matrizes de CS/PEDOT

O trabalho iniciou-se com o estudo das condições de polimerização do PEDOT na presença de um polímero. No final desse estudo selecionaram-se quatro condições que permitiram obter híbridos CS/PEDOT, obtidos usando quatro soluções oxidantes diferentes.

Uma vez obtidos estes híbridos, foi efetuado um estudo das condições de eletrofiação. Fiaram-se as seguintes soluções:

- Híbrido CS/PEDOT a 1,8% (obtido por oxidação com a solução de FeCl_3 em etanol), CS a 1,8% e PEO a 1,2% em ácido acético 90% (v/v);
- Híbrido CS/PEDOT a 1,8% (obtido por oxidação com a solução de FeCl_3 em água), CS a 1,8% e PEO a 1,2% em ácido acético 90% (v/v);
- Híbrido CS/PEDOT a 1,8% (obtido por oxidação com a solução de APS em água), CS a 1,8% e PEO a 1,2% em ácido acético 90% (v/v);
- Híbrido CS/PEDOT a 1,8% (obtido por oxidação com a solução de APS e FeCl_3 em água), CS a 1,8% e PEO a 1,2% em ácido acético 90% (v/v);

Estas soluções serão referidas ao longo do texto como soluções de CS/PEDOT e as soluções controlo serão referidas como CS CTRL A partir deste

subcapítulo, e até ao fim do trabalho, os filmes e fibras produzidos a partir dos híbridos de CS/PEDOT obtidos nas várias condições de polimerização passarão a designar-se pela seguinte notação:

- “CS/PEDOT- FeCl_3 (Aq)” será relativo ao híbrido de CS/PEDOT obtido por oxidação com FeCl_3 em água;

- “CS/PEDOT- FeCl_3 (Et)” será relativo ao híbrido de CS/PEDOT obtido por oxidação com FeCl_3 em etanol;

- “CS/PEDOT-APS” será relativo ao híbrido de CS/PEDOT obtido por oxidação com APS em água;

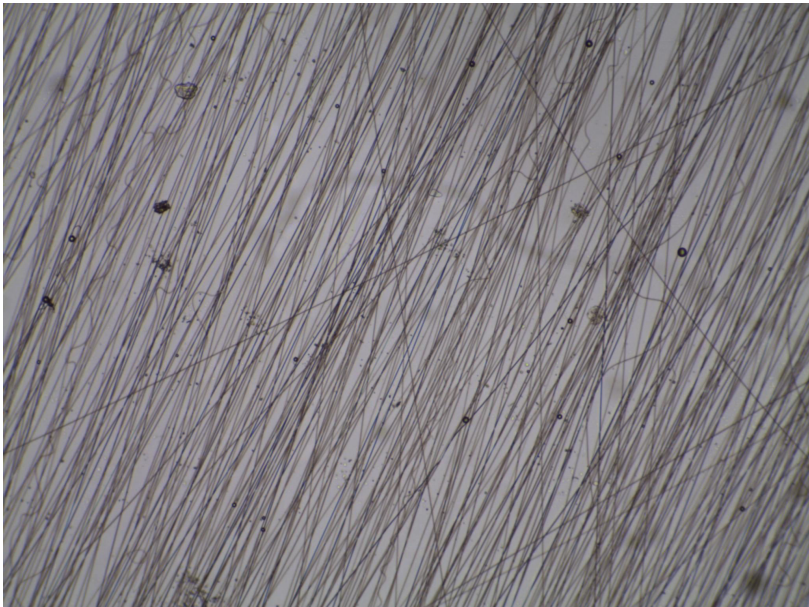
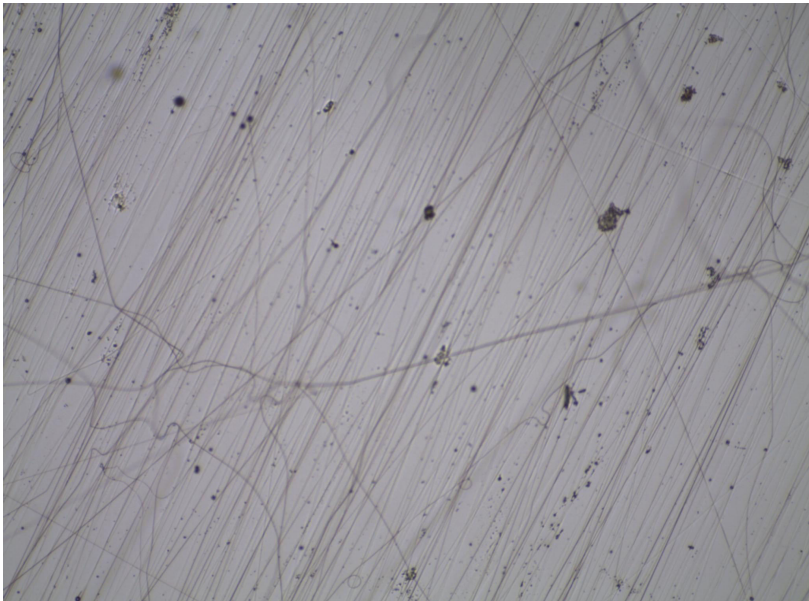
- “CS/PEDOT- FeCl_3 / APS” será relativo ao híbrido de CS/PEDOT obtido por oxidação com FeCl_3 e APS em água.

O impacto dos parâmetros de fiação distância agulha-coletor, tensão aplicada e caudal, na morfologia das fibras obtidas foi avaliado por observação microscópica. Cada parâmetro foi variado individualmente a partir da seguinte situação de referência, já anteriormente ajustada para a solução de CS e PEO [80]: distância agulha coletor: 20 cm; tensão aplicada: 13 kV; agulha 25 G e caudal 0,5 ml/h. A tabela 3.1 resume qualitativamente os efeitos das variações de parâmetros verificados, através da medição dos diâmetros das nanofibras obtidas.

Tabela 3.1 - Efeitos dos parâmetros na morfologia das fibras.

PARÂMETROS	EFEITO MORFOLÓGICO
DISTÂNCIA AGULHA-COLETOR	↓ Distância agulha-coletor \Rightarrow ↓ Diâmetro das fibras
TENSÃO	↑ Tensão \Rightarrow ↓ Diâmetro das fibras
CAUDAL	↑ Caudal \Rightarrow ↑ Diâmetro das fibras

Nas figuras 3.1 e 3.2 são apresentadas imagens de MO correspondentes às variações dos diferentes parâmetros, para a solução de CS e CS/PEDOT.

<p>Imagem de MO</p> <p>4000 rpm</p>	
	<p>20 cm</p> <p>10 kV</p> <p>0,5 ml/h</p>
	<p>10 cm</p> <p>10 kV</p> <p>0,5 ml/h</p>

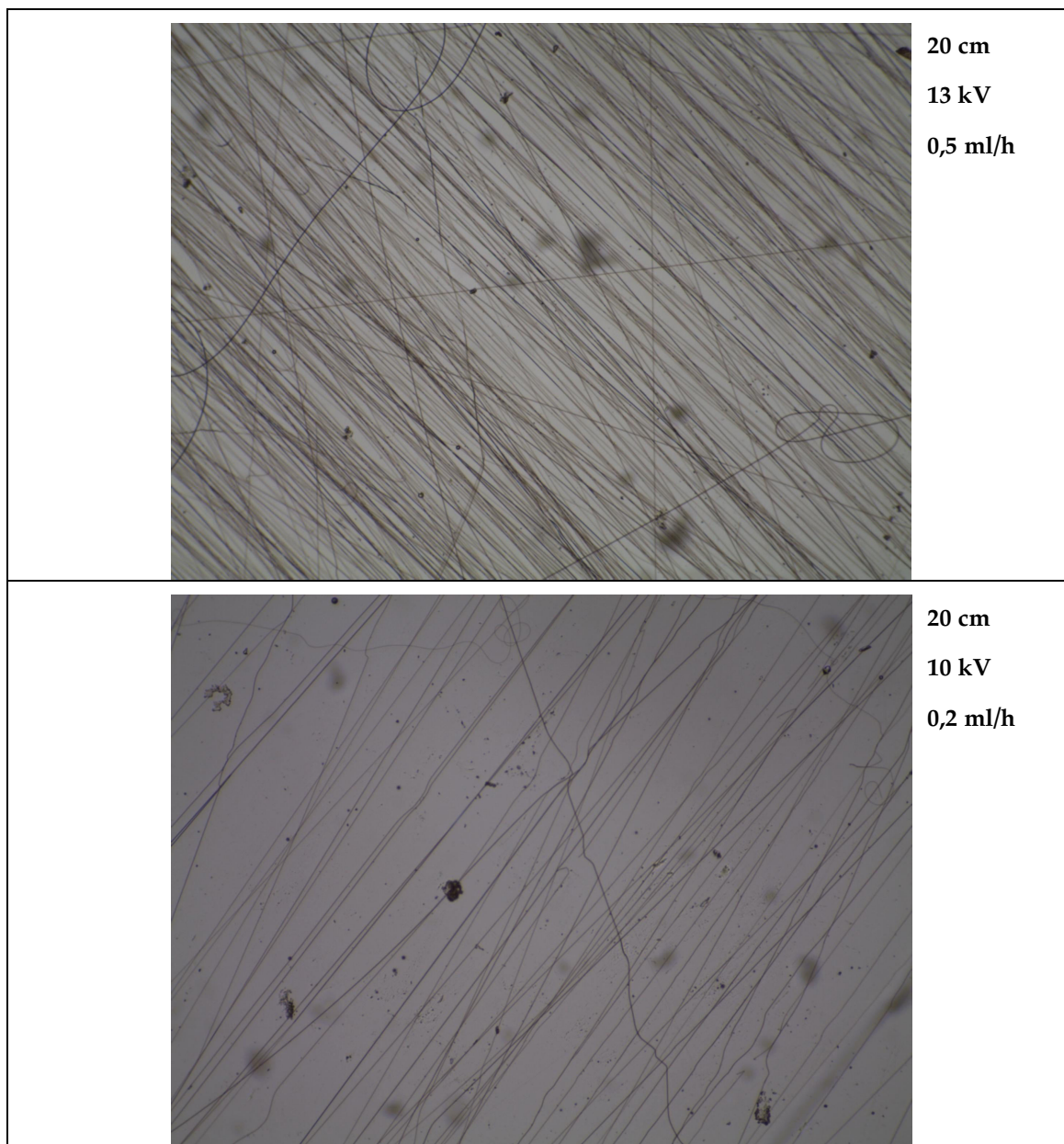

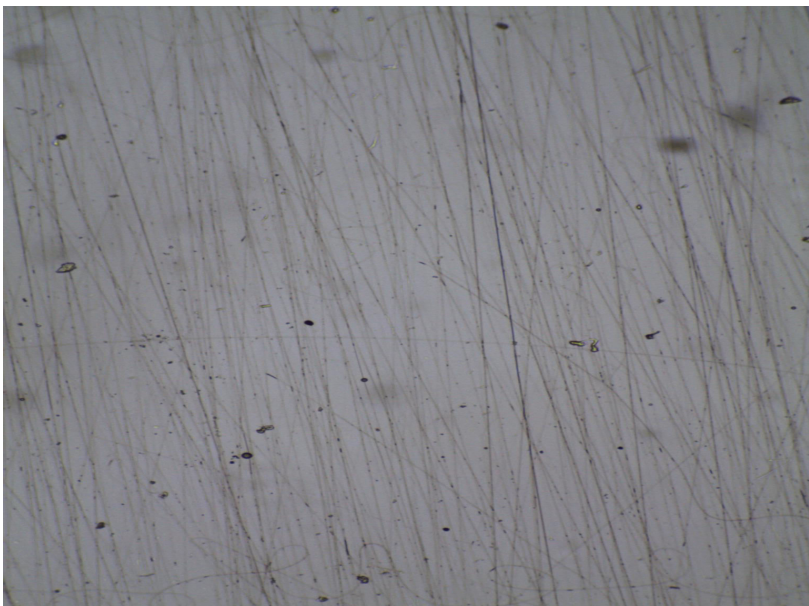


Figura 3.1 - Imagens de MO 100x de fibras obtidas a partir de uma solução de CS 1,8% e PEO 0,4% em ácido acético 90%(v/v) com vários conjuntos de parâmetros. Comparativamente aos parâmetros 20 cm, 10 kV e 0,5 ml/h, é possível verificar a influência das variações da distância agulha-coletor, tensão e caudal, no diâmetro das nanofibras. Os efeitos estão sumariados na tabela 3.1.

<p>Imagem de MO</p> <p>4000 rpm</p>	
	<p>20 cm</p> <p>13 kV</p> <p>0,3 ml/h</p>
	<p>30 cm</p> <p>13 kV</p> <p>0,3 ml/h</p>

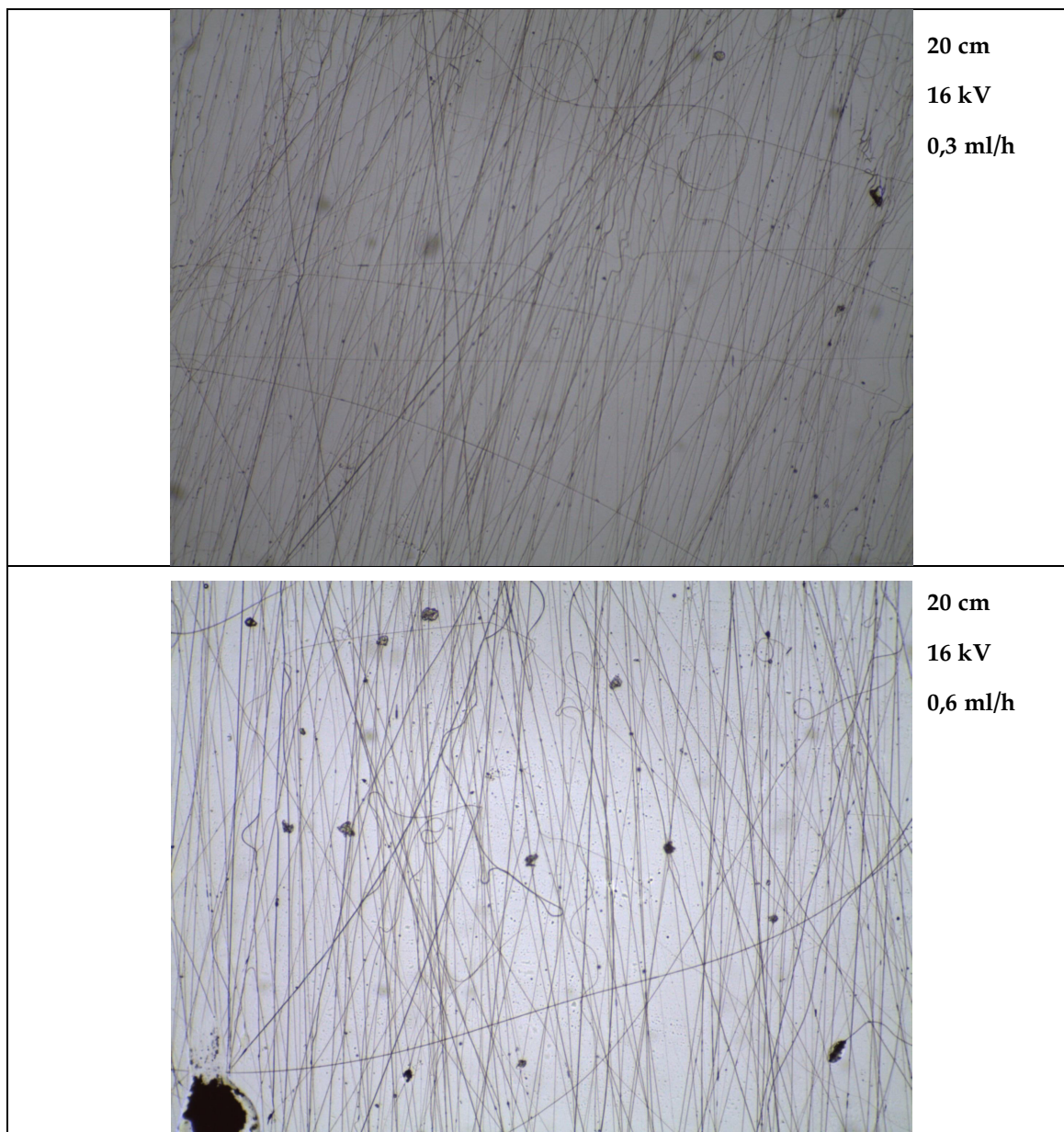


Figura 3.2 - Imagens de MO 100x de fibras obtidas a partir de uma solução de CS 1,8% CS/PEDOT 1,8% e PEO 1,2% em ácido acético 90% (v/v), com vários conjuntos de parâmetros. A variação de um só parâmetro entre duas situações permite verificar a sua influência no diâmetro das nanofibras de CS/PEDOT.

Em seguida, nas figuras 3.3 a 3.6, apresentam-se imagens de MO (VWR VisiScope e Nikon Eclipse) das matrizes de nanofibras de CS/PEDOT produzidas a 16 kV, 20 cm, com caudal de 0,6 ml/h, a 2200 rpm.

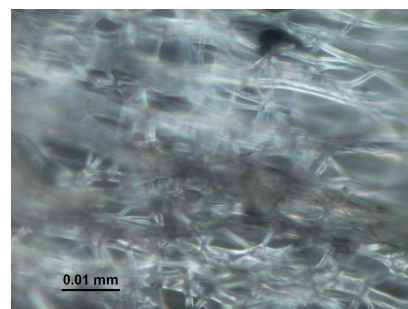
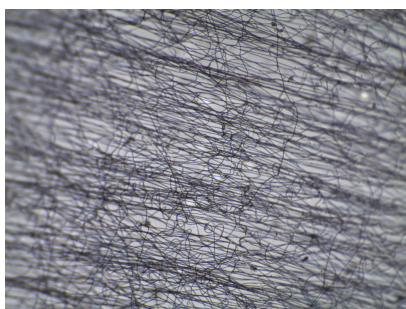


Figura 3.3 - Nanofibras do primeiro lote, CS/ PEDOT-FeCl₃ (Et): 400x e 1000x (da esquerda para a direita).

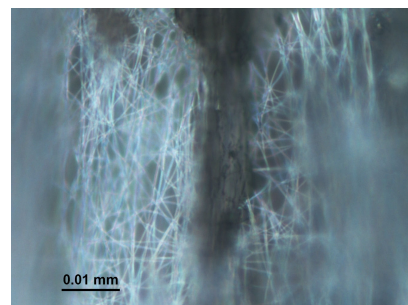
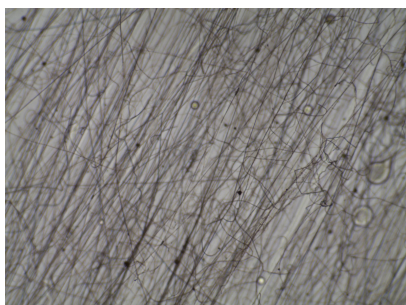


Figura 3.4 – Nanofibras do segundo lote, CS/ PEDOT-FeCl₃ (Aq): 400x e 1000x (da esquerda para a direita).

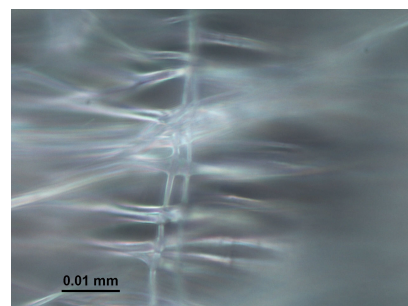
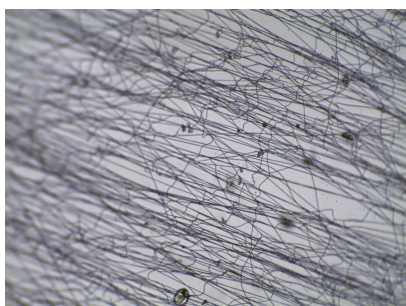


Figura 3.5 - Nanofibras do segundo lote, CS/ PEDOT-APS: 100x, 400x e 1000x (da esquerda para a direita).



Figura 3.6 - Nanofibras do segundo lote, CS/ PEDOT-FeCl₃-APS: 100x, 400x e 1000x (da esquerda para a direita).

As matrizes de nanofibras foram produzidas com sucesso, exibindo algum alinhamento para as velocidades de rotação mais elevadas.

Na figura 3.7 é possível observar dois exemplares macroscópicos de nanofibras de CS/PEDOT- FeCl₃ (Et)). Estas matrizes são muito maleáveis e incham quando colocadas em água, mantendo a sua estrutura.

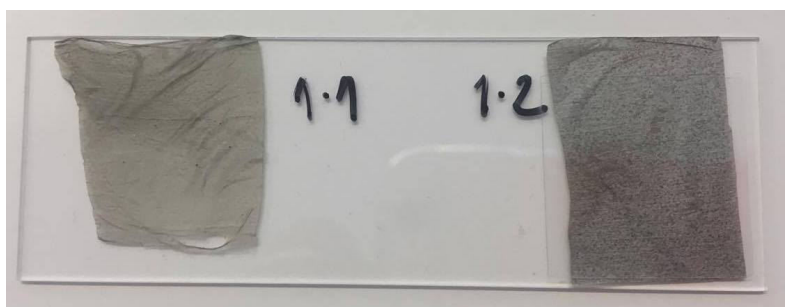


Figura 3.7 - Nanofibras eletrofiadas de CS/PEDOT-FeCl₃ (Et) à esquerda a amostra do primeiro lote e à direita a do segundo lote.

3.2 Análise da condutividade dos filmes

Para a especificação das dimensões utilizadas para os cálculos da condutividade tanto dos filmes como das fibras, as letras ℓ , d e e indicarão, respetivamente, o comprimento, largura e espessura a considerar para os cálculos. A secção reta será $A = d \times e$.

A medição da condutividade dos filmes de CS/PEDOT foi primeiramente levada a cabo através da utilização da fita de carbono e duas pontas de prova. Contudo, os gráficos I/V obtidos demonstraram-se irregulares e com valores de intensidade de corrente baixos o que levou a suspeitar do processo de medição.

Um valor interessante seria na ordem de 10^{-4} S/cm [84] e o valor médio obtido para todos os filmes foi de 2×10^{-8} S/cm, com valor médio de $\frac{1}{R}$ de $3 \times 10^{-10} \Omega^{-1}$ (vide figura 3.8).

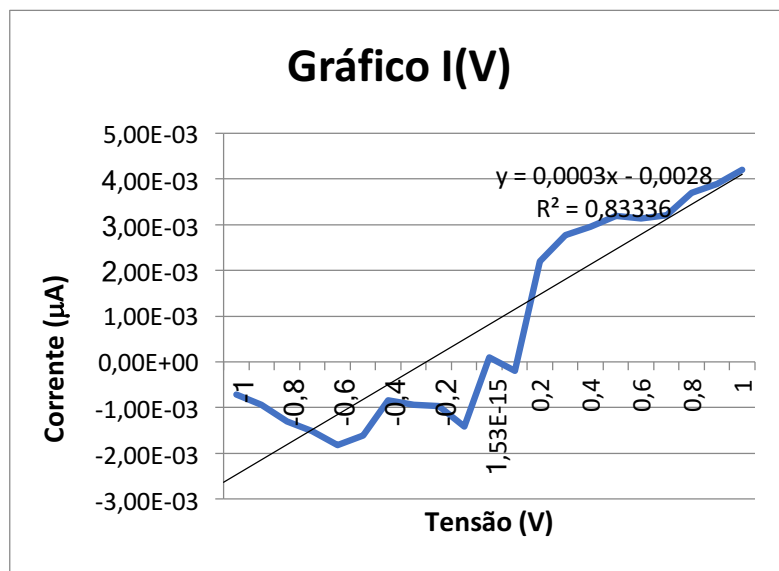


Figura 3.8 - Gráfico I(V) obtido para um filme de CS/PEDOT-FeCl₃ (Et) de dimensões $\ell = 5$ mm, $d = 5$ mm e $e = 0,1531$ mm (10 mm x 10 mm). O declive do ajuste linear fornece $\frac{1}{R}$ e com este valor calcula-se a condutividade do material (ver subcapítulo 2.4).

A substituição das pontas de prova por crocodilos, como indicado no subcapítulo 2.4, produziu gráficos I(V) que se ajustam bem a uma reta de declive positivo e valor de $\frac{1}{R}$ mais elevado (vide figura 3.9).

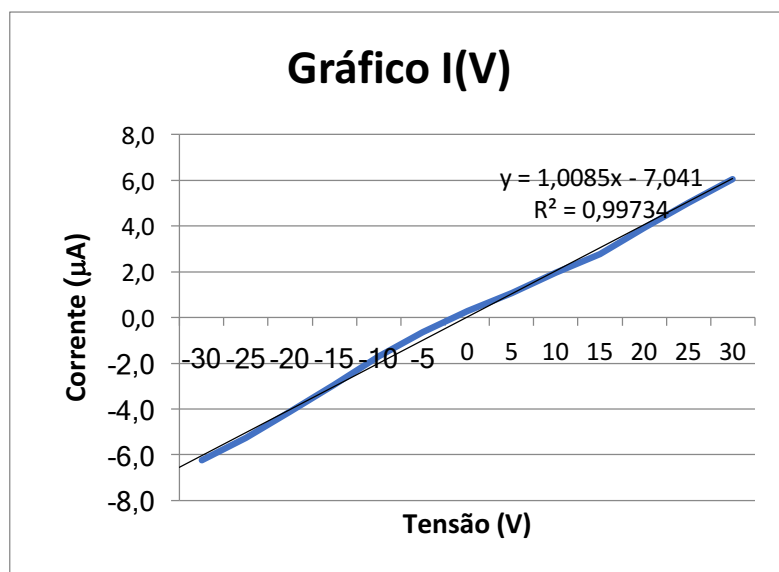


Figura 3.9 - Gráfico I(V) obtido para um filme de CS/PEDOT-FeCl₃ (Et) de dimensões $\ell = 5$ mm, $d = 5$ mm e $e = 0,1531$ mm (10 mm x 10 mm). O declive do ajuste linear fornece $\frac{1}{R}$ e com este valor calcula-se a condutividade do material (ver subcapítulo 2.4).

O gráfico obtido a partir das medições efetuadas nos filmes com as novas dimensões conduziu a valores de condutividade mais elevados (vide figura 3.10).

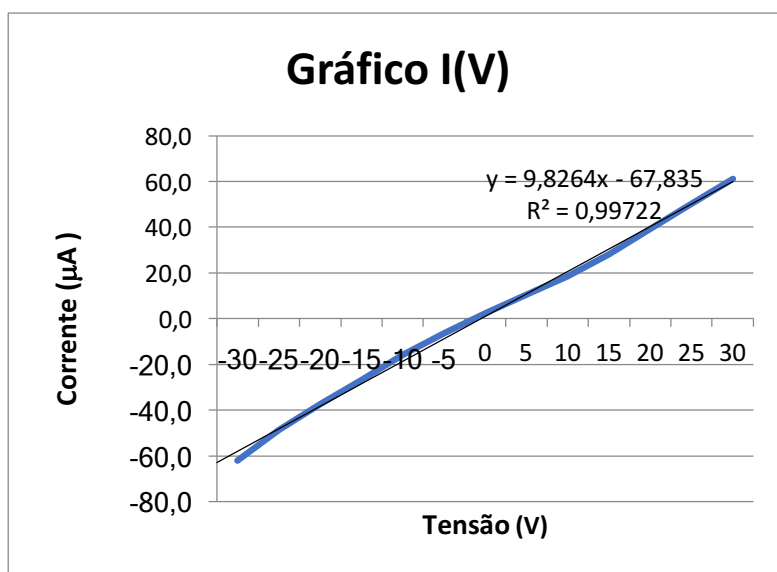


Figura 3.10 - Gráfico I(V) obtido para um filme de CS/PEDOT-FeCl₃ (Et) de dimensões $\ell = 5$ mm, $d = 5$ mm e $e = 0,1531$ mm (5 mm x 9 mm). O declive do ajuste linear fornece $\frac{1}{R}$ e com este valor calcula-se a condutividade do material (ver subcapítulo 2.4).

Das quatro soluções CS/PEDOT produzidas com os diferentes agentes oxidantes, foram depositados dois lotes de filmes, lote 1 e lote 2, para as duas dimensões de filme consideradas, cuja condutividade média pode ser observada nas figuras 3.11 e 3.12, e respetivas tabelas, 3.4 e 3.5. É notório o aumento da condutividade associado à diminuição das dimensões dos filmes para as cinco condições dos dois lotes.

Na tabela 3.2, apresenta-se o resumo das medições de espessura (e), declive do gráfico I(V) ($\frac{1}{R}$) e condutividades (σ), efetuadas com $\ell = 5$ mm e $d = 5$ mm, para filmes quadrados de 10 mm de lado, de ambos os lotes.

Tabela 3.2 - Tabela resumo das espessuras, declives e condutividade de filmes quadrados de 10 mm de lado, com $\ell = 5$ mm e $d = 5$ mm, cujos valores associados a cada condição de produção, se referem aos valores do primeiro lote e aos do segundo, em seguida.

	e	$\frac{1}{R}$	σ
CS/PEDOT-FeCl ₃ (Et)	0,108 mm	$2 \times 10^{-6} \Omega^{-1}$	214 $\mu\text{S/cm}$

CS/PEDOT-FeCl ₃ (Et)	0,108 mm	$4 \times 10^{-6} \Omega^{-1}$	391 $\mu\text{S/cm}$
CS/PEDOT-FeCl ₃ (Aq)	0,119 mm	$8 \times 10^{-7} \Omega^{-1}$	57,1 $\mu\text{S/cm}$
CS/PEDOT-FeCl ₃ (Aq)	0,119 mm	$6 \times 10^{-7} \Omega^{-1}$	48,7 $\mu\text{S/cm}$
CS/PEDOT-APS	0,0833 mm	$3 \times 10^{-7} \Omega^{-1}$	161 $\mu\text{S/cm}$
CS/PEDOT-APS	0,0833 mm	$4 \times 10^{-7} \Omega^{-1}$	52,8 $\mu\text{S/cm}$
CS/PEDOT-FeCl ₃ -APS	0,179 mm	$4 \times 10^{-7} \Omega^{-1}$	21,2 $\mu\text{S/cm}$
CS/PEDOT-FeCl ₃ -APS	0,179 mm	$2 \times 10^{-6} \Omega^{-1}$	123 $\mu\text{S/cm}$
CS CTRL	0,0827 mm	$5 \times 10^{-8} \Omega^{-1}$	7,26 $\mu\text{S/cm}$

Na tabela 3.3, apresenta-se o resumo das medições de espessura (e), declive do gráfico $I(V)$ ($\frac{1}{R}$) e condutividades (σ), efetuadas com $\ell = 5 \text{ mm}$ e $d = 5 \text{ mm}$, para filmes retangulares de 5 mm de largura e 9 mm de comprimento, de ambos os lotes.

Tabela 3.3 - Tabela resumo das espessuras, declives e condutividade de filmes retangulares de 5 mm de largura e 9 mm de comprimento, com $\ell = 5 \text{ mm}$ e $d = 5 \text{ mm}$, cujos valores associados a cada condição de produção, se referem aos valores do primeiro lote e aos do segundo, em seguida.

	e	$1/R$	σ
CS/PEDOT-FeCl ₃ (Et)	0,108 mm	$8,5 \times 10^{-6} \Omega^{-1}$	826 $\mu\text{S/cm}$
CS/PEDOT-FeCl ₃ (Et)	0,108 mm	$3 \times 10^{-6} \Omega^{-1}$	298 $\mu\text{S/cm}$
CS/PEDOT-FeCl ₃ (Aq)	0,119 mm	$1 \times 10^{-6} \Omega^{-1}$	819 $\mu\text{S/cm}$
CS/PEDOT-FeCl ₃ (Aq)	0,119 mm	$4,5 \times 10^{-6} \Omega^{-1}$	399 $\mu\text{S/cm}$
CS/PEDOT-APS	0,0833 mm	$4,5 \times 10^{-6} \Omega^{-1}$	570 $\mu\text{S/cm}$
CS/PEDOT-APS	0,0833 mm	$3 \times 10^{-6} \Omega^{-1}$	360 $\mu\text{S/cm}$
CS/PEDOT-FeCl ₃ -APS	0,179 mm	$6,5 \times 10^{-6} \Omega^{-1}$	363 $\mu\text{S/cm}$
CS/PEDOT-FeCl ₃ -APS	0,179 mm	$8 \times 10^{-6} \Omega^{-1}$	458 $\mu\text{S/cm}$

CS CTRL	0,0827 mm	$2,5 \times 10^{-7} \Omega^{-1}$	36,3 $\mu\text{S}/\text{cm}$
---------	-----------	----------------------------------	------------------------------

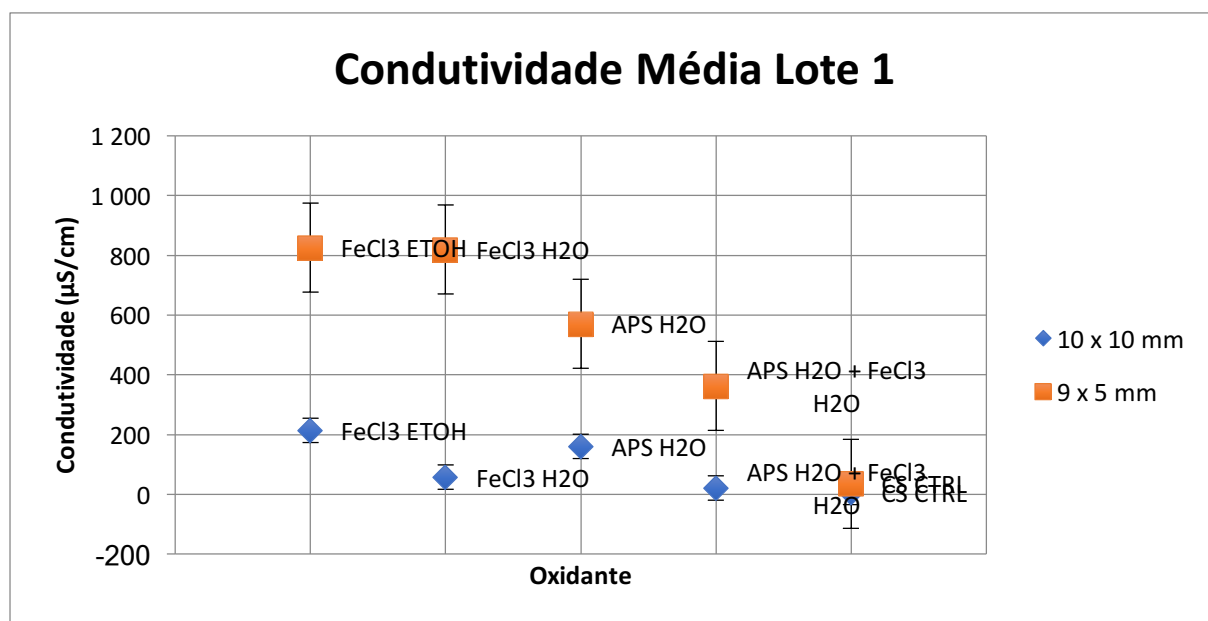


Figura 3.11 - Gráfico de dispersão da condutividade em função de cada condição de polimerização para o primeiro lote de filmes produzidos. As barras de incerteza correspondem ao erro do desvio padrão experimental.

Para os cinco tipos de filmes testados, verificou-se um aumento da condutividade medida para os filmes com menores dimensões, sendo que $\ell = 5 \text{ mm}$ e $d = 5 \text{ mm}$, como se pode confirmar com a tabela 3.6.

Tabela 3.4 - Tabela de condutividade referente aos filmes do primeiro lote.

	Filme quadrado (10 mm x 10 mm)	Filme retangular (5 mm x 9 mm)
CS/PEDOT-FeCl ₃ (Et)	214 ± 52 $\mu\text{S}/\text{cm}$	826 ± 33 $\mu\text{S}/\text{cm}$
CS/PEDOT-FeCl ₃ (Aq)	57,1 ± 6,2 $\mu\text{S}/\text{cm}$	819 ± 21 $\mu\text{S}/\text{cm}$
CS/PEDOT-APS	161 ± 81 $\mu\text{S}/\text{cm}$	570 ± 58 $\mu\text{S}/\text{cm}$
CS/PEDOT-FeCl ₃ /APS	21,2 ± 4,5 $\mu\text{S}/\text{cm}$	363 ± 16 $\mu\text{S}/\text{cm}$
CS CTRL	7,3 ± 1,2 $\mu\text{S}/\text{cm}$	36,3 ± 8,6 $\mu\text{S}/\text{cm}$

Já para o segundo lote de filmes, a variação observada entre os valores de filmes de dimensões diferentes não mostrou sempre a mesma tendência. Existindo o caso de ambas as dimensões demonstrarem condutividades muito semelhantes, como reporta a figura 3.10.

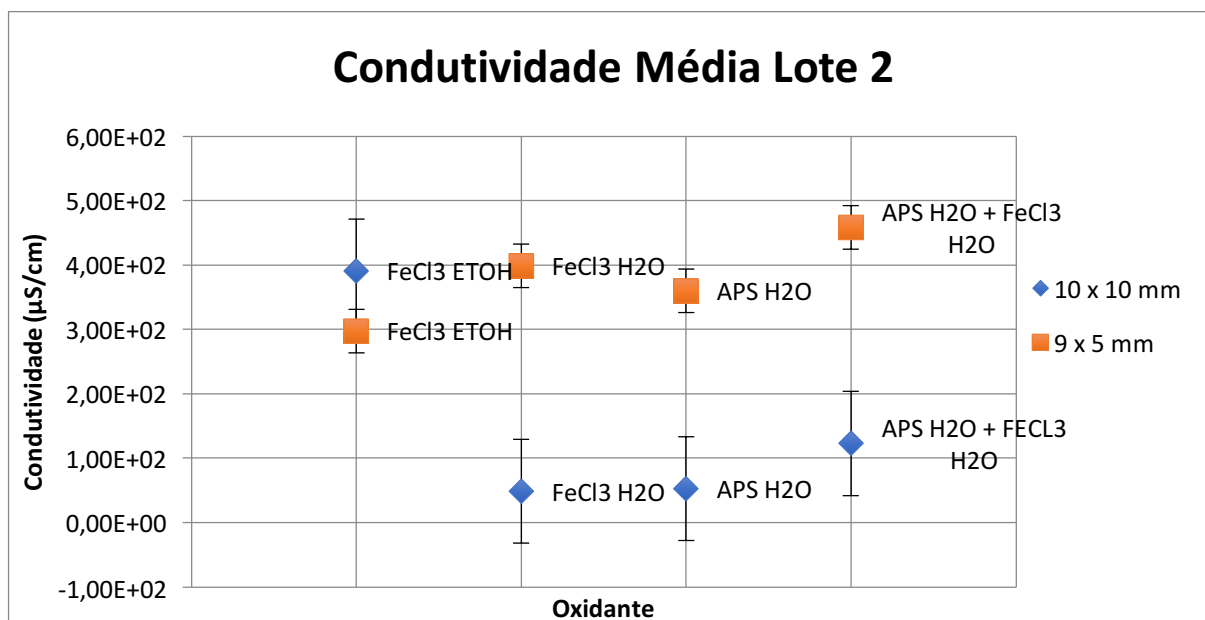


Figura 3.12 - Gráfico de dispersão da condutividade em função de cada condição de polimerização para o segundo lote de filmes produzidos. As barras de incerteza correspondem ao erro do desvio padrão experimental.

Neste lote, a diminuição das dimensões dos filmes não se refletiu no necessário aumento da condutividade medida do filme de CS/PEDOT-FeCl₃ (Et). Os valores para os dois lotes desta condição mostram-se bastante próximos, sendo que $\ell = 5 \text{ mm}$ e $d = 5 \text{ mm}$, como se pode confirmar com a tabela 3.7.

Tabela 3.5 - Tabela de condutividade referente aos filmes do segundo lote.

	Filme quadrado (10 mm x 10 mm)	Filme retangular (5 mm x 9 mm)
CS/PEDOT-FeCl ₃ (Et)	391 ± 19 μS/cm	298 ± 19 μS/cm
CS/PEDOT-FeCl ₃ (Aq)	48,7 ± 1,7 μS/cm	399 ± 11 μS/cm
CS/PEDOT-APS	52,8 ± 4,8 μS/cm	360 ± 49 μS/cm
CS/PEDOT-FeCl ₃ /APS	123 ± 11 μS/cm	458 ± 33 μS/cm

Para a condição CS/PEDOT-FeCl₃(Et), os valores medidos para os filmes de dimensões 10 mm x 10 mm e 5 mm x 9 mm, são concordantes (com $\ell = 5$ mm e $d = 5$ mm). Para os restantes casos, observou-se um aumento mais ou menos significativo na condutividade.

Este aumento da condutividade está relacionado com a variação da área superficial do filme de 10 mm x 10 mm para 5 mm x 9 mm. Assumindo um campo elétrico uniforme, a intensidade de um campo elétrico é diretamente proporcional ao número de linhas de campo por unidade de área que atravessa uma pequena superfície, normal às linhas. Assim, o campo elétrico é mais forte em pontos onde as linhas de campo se encontrem mais próximas, e mais fraco nos pontos onde estas estão mais distantes. Mantendo a distância entre os eletrodos, a diminuição da área superficial dos filmes refletiu-se num aumento da condutividade devido à diminuição da influência das linhas de campo elétrico à restante área de filme.

De uma maneira geral, o FeCl₃ demonstrou ser um oxidante mais eficiente que o APS, independentemente de se encontrar dissolvido em ETOH ou H₂O, com os filmes incorporando híbridos produzidos usando soluções oxidantes de FeCl₃ a evidenciarem condutividades muito próximas. A mais-valia da utilização de ETOH reside na dificuldade da dispersão do EDOT em H₂O, havendo uma separação de fases, visível no MO VWR VisiScope (como evidencia a figura 3.13).

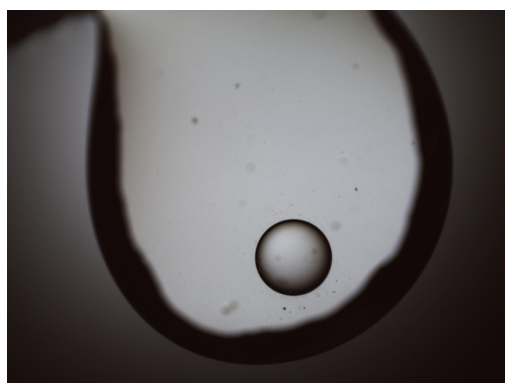


Figura 3.13 – Imagem de microscópio ótico da evidência da separação de fases e formação de micelas do EDOT em água (40x).

A polimerização do EDOT com FeCl_3 em ETOH foi mais rápida, demonstrando cor azul escura após 7 dias, ao contrário das demais soluções que demoraram cerca de 10 dias a adquirir o mesmo tom azul escuro. Esta maior velocidade leva a crer que, após o mesmo tempo de reação, no caso do FeCl_3 em ETOH, a polimerização foi levada a cabo numa maior extensão que as demais. A maior condutividade dos filmes relacionados com esta condição que é observável nos gráficos de condutividades (figuras 3.11, 3.12 e 3.14) pode estar relacionada com este facto.

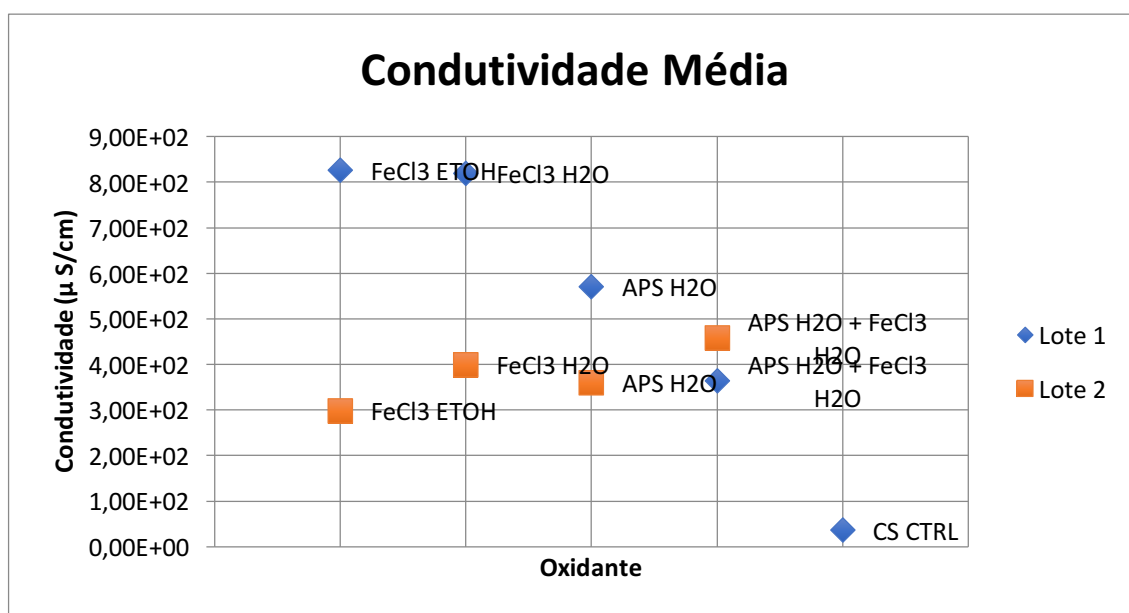


Figura 3.14 – O primeiro lote comprova ter maior condutividade média, relativamente ao lote que lhe sucedeu.

Quando se comparam os valores de condutividade medida para os filmes de menor dimensão dos dois lotes, verificamos valores de condutividade na mesma ordem de grandeza, relativamente próximos. Mas pelo que se pode verificar, a condutividade do primeiro lote foi superior à do segundo. O que poderá estar relacionado com inhomogeneidades de distribuição de polímero condutor na solução de CS e ácido acético, de onde se fizeram os filmes (figura 3.14).

Comparativamente à condutividade que o PEDOT pode atingir, a partir de soluções comercialmente disponíveis de PEDOT: PSS, de cerca de 210 S/cm [31], uma condutividade média de $3,990 \times 10^{-4}$ S/cm é muito baixa, mas interessante do ponto de vista fisiológico. Tendo em conta que os filmes obtidos possuem muito mais CS do que PEDOT, este valor de condutividade mostra-se

semelhante ao obtido por Kiristi *et al.* para nanofibras eletrofiadas de quitosano e PEDOT, de $6,357 \times 10^{-4} \text{ S/cm}$ [84]. Neste trabalho, os autores utilizaram uma razão EDOT: APS de 1:2, procedendo à polimerização do monómero em solução, a mistura do quitosano foi feita posteriormente à polimerização na proporção de PEDOT:CS de 1:1, em volume.

3.3 Análise da condutividade das nanofibras

Das mesmas quatro soluções CS/PEDOT de onde se depositaram os filmes, foram eletrofiados dois lotes de nanofibras, lote 1 e lote 2, cuja condutividade média pode ser observada na figura 3.15 e respectiva tabela, 3.7.

Na tabela 3.6, apresenta-se o resumo das medições de espessura (e), declive do gráfico $I(V)$ ($\frac{1}{R}$) e condutividades (σ), efetuadas com $\ell = 5 \text{ mm}$ e $d = 5 \text{ mm}$, para as matrizes de nanofibras de ambos os lotes.

Tabela 3.6 - Tabela resumo das espessuras, declives e condutividade de matrizes de nanofibras, com $\ell = 5 \text{ mm}$ e $d = 5 \text{ mm}$, cujos valores associados a cada condição de produção, se referem aos valores do primeiro lote e aos do segundo, em seguida.

	e	$\frac{1}{R}$	σ
CS/PEDOT-FeCl ₃ (Et)	0,007 mm	$8 \times 10^{-7} \Omega^{-1}$	1,14 $\mu\text{S/cm}$
CS/PEDOT-FeCl ₃ (Et)	0,008 mm	$1 \times 10^{-6} \Omega^{-1}$	0,92 $\mu\text{S/cm}$
CS/PEDOT-FeCl ₃ (Aq)	0,031 mm	$5 \times 10^{-7} \Omega^{-1}$	0,155 $\mu\text{S/cm}$
CS/PEDOT-FeCl ₃ (Aq)	0,034 mm	$9 \times 10^{-7} \Omega^{-1}$	0,265 $\mu\text{S/cm}$
CS/PEDOT-APS	0,043 mm	$4 \times 10^{-7} \Omega^{-1}$	0,098 $\mu\text{S/cm}$
CS/PEDOT-APS	0,042 mm	$2 \times 10^{-6} \Omega^{-1}$	0,4 $\mu\text{S/cm}$
CS/PEDOT-FeCl ₃ -APS	0,047 mm	$1 \times 10^{-6} \Omega^{-1}$	0,234 $\mu\text{S/cm}$
CS/PEDOT-FeCl ₃ -APS	0,049 mm	$4 \times 10^{-6} \Omega^{-1}$	0,62 $\mu\text{S/cm}$
CS CTRL	0,008 mm	$4 \times 10^{-10} \Omega^{-1}$	0,00043 $\mu\text{S/cm}$

A condutividade determinada para as amostras de nanofibras apresenta valores mais baixos do que a calculada para os filmes, mantendo $\ell = 5 \text{ mm}$ e $d = 5 \text{ mm}$. Este facto decorre de se utilizarem valores aparentes da secção reta de material na amostra que não contemplam a inhomogeneidade (porosidade) da estrutura da matriz de nanofibras e são por isso maiores do que a secção preenchida por material. Os filmes, como são substratos essencialmente densos, possuem secções retas de material mais idênticas às do correspondente valor aparente. Assim a condutividade medida nos filmes dará uma melhor estimativa da condutividade do material.

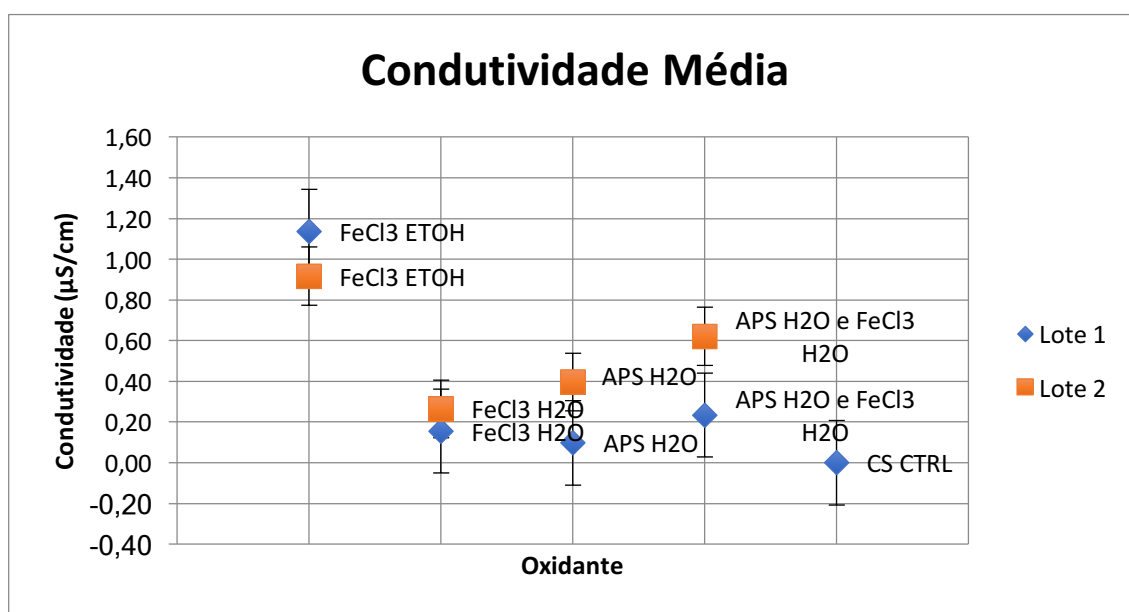


Figura 3.15 – Condutividade média dos dois lotes de nanofibras produzidos.

Tabela 3.7 - Valores associados à figura 3.15, condutividade média dos dois lotes de nanofibras.

	Lote 1	Lote 2
CS/PEDOT-FeCl ₃ (Et)	1,14E ± 0,79 μS/cm	0,92 ± 0,31 μS/cm
CS/PEDOT-FeCl ₃ (Aq)	0,1550 ± 0,0065 μS/cm	0,265 ± 0,081 μS/cm
CS/PEDOT-APS	0,0098 ± 0,0035 μS/cm	0,40 ± 0,29 μS/cm
CS/PEDOT-FeCl ₃ /APS	0,234 ± 0,049 μS/cm	0,62 ± 0,29 μS/cm
CS CTRL	0,00043 ± 0,00011 μS/cm	

Tal como verificado para os filmes, a condutividade das nanofibras revelou-se notoriamente mais alta na oxidação com FeCl_3 em ETOH. Recorde-se que esta foi a solução a ficar de cor azul escura em menos tempo.

Proporções diferentes EDOT: oxidante e CS: EDOT fariam diferença na condutividade do material, tendo sido utilizado um valor muito grande de concentração molar de monómero (superior a 5:1). Como já foi abordado, um valor mais apropriado, de acordo com a literatura, por forma a existir mais dopagem/polimerização de PEDOT seria, por exemplo, utilizar uma proporção EDOT: oxidante de 1:2,33 [82].

3.4 Diâmetro médio das nanofibras de CS/ PEDOT

Na figura 3.16 apresentam-se os diâmetros médios obtidos para as quatro amostras dos dois lotes de nanofibras produzidos, com a respetiva tabela de valores (tabela 3.8).

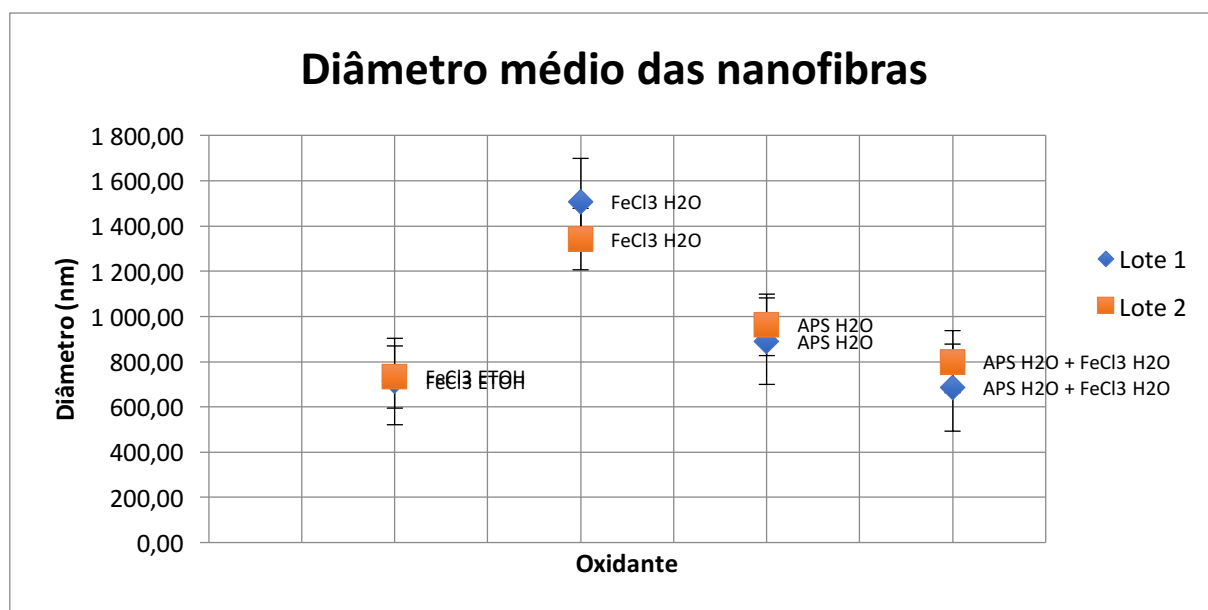


Figura 3.16 - Diâmetro médio das nanofibras para as quatro condições, com os parâmetros 20 cm, 18 kV, 0.6 ml/h e 2200 rpm.

Tabela 3.8 - Valores associados à figura 3.16, diâmetro médio dos dois lotes de nanofibras.

	Lote 1	Lote 2
--	--------	--------

CS/PEDOT-FeCl₃(Et)	713 ± 68 nm	733 ± 46 nm
CS/PEDOT-FeCl₃(Aq)	1510 ± 134 nm	1340 ± 360 nm
CS/PEDOT-APS	890 ± 30 nm	963 ± 28 nm
CS/PEDOT-FeCl₃/APS	685 ± 76 nm	800 ± 72 nm

É também possível relacionar a condutividade das nanofibras com o seu diâmetro médio, sendo que os oxidantes que demonstram maiores condutividades são também os que demonstram menor diâmetro. O aumento do diâmetro está associado a um menor estiramento das fibras na presença de um campo elétrico constante, decorrente da menor condutividade da solução, que é plausível que seja superior se a sua parte polimérica tiver maior condutividade.

É possível constatar proximidade nos valores de condutividade entre os dois lotes de cada condição e diferenças acentuadas na condutividade entre condições. O FeCl₃ em H₂O, que nos filmes tinha obtido uma condutividade próxima da do FeCl₃ em ETOH, destaca-se desta vez pela negativa, obtendo valores muito baixos, relativamente próximos do APS em H₂O, tal como a junção de ambos.

Desta análise também se pode concluir que a maior presença de água em três das quatro condições demonstrou ser um fator condicionante da polimerização do EDOT e, conseqüentemente, da condutividade. Num ambiente rico em água, a concentração local de EDOT em micelas é muito alta e como a polimerização se dá relativamente rápido, existe então a separação de fases do PEDOT. Durante o processo de polimerização, a presença de água no ácido acético a 45% (v/v) auxiliou a dissolução do quitosano ao mesmo tempo que comprometeu a dispersão do EDOT. Com percentagens inferiores de AcAc quase não se verificou ocorrência de polimerização (com base na cor da solução) e com valores mais elevados, a gelificação quase imediata do quitosano com o FeCl₃ dificultava a reação deste com o EDOT. Ao que se concluiu que o ácido acético a 45% (v/v) possibilitava a dissolução do quitosano e a reação de oxidação entre o FeCl₃ e o EDOT, sem que houvesse floculação.

O ETOH facilitou a reação do FeCl_3 com o monômero que, para além de rápida, se demonstrou mais eficaz, tanto nos filmes como nas nanofibras. Nos restantes casos, a presença de cerca de 3 vezes mais água levou a uma separação de fases acentuada que acabou por se refletir nos valores de condutividade. A insolubilidade do EDOT em água revela-se então determinante e condicionante para a polimerização e, consequentemente, para a condutividade.

3.5 Análise dos resultados de UV-vis

De acordo com a literatura, a polimerização oxidativa do EDOT origina PEDOT reduzido, de cor azul escura, e neutro, cujos espectros de transmitância e absorvância se podem observar nas figuras 3.17 e 3.18.

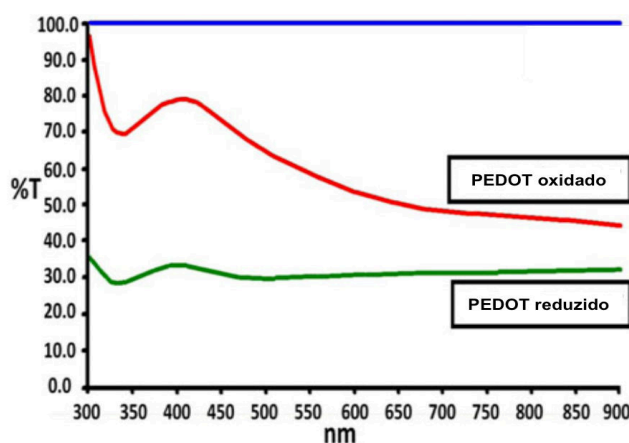


Figura 3.17 - Espectro UV-vis de filmes de PEDOT no estado oxidado e reduzido, com um pico de absorção perto dos 350 nm (adaptado [62]).

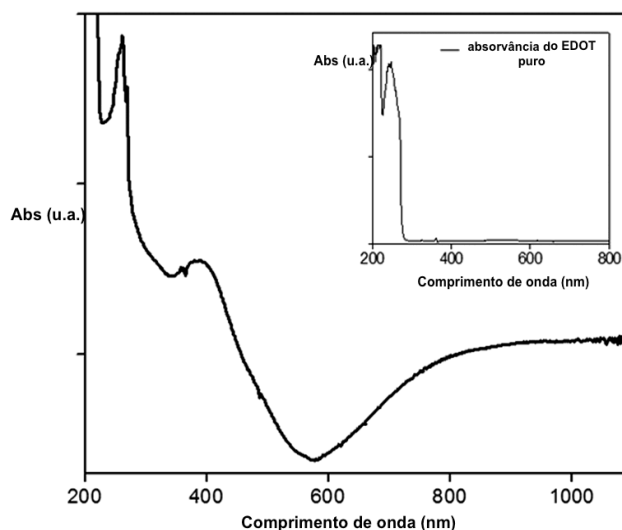


Figura 3.18 - Absorção UV-vis de uma solução etanoica de PEDOT sintetizado numa solução 0,1 M NaCl, 0,1 M EDOT e 0,1 M FeCl_3 , ou seja, numa proporção estequiométrica de EDOT: FeCl_3 de 1:1 (adaptado [88]). É observável um pico de absorção nos 390 nm e uma larga banda de absorção até 580 nm, referente à existência de um polarão responsável pela ligeira condutividade do material. Os picos de EDOT observam-se a 215 nm e 243 nm e podem ser observados no gráfico do PEDOT.

Este estado neutro do PEDOT, supostamente não condutor, está associado a uma cor azul escura, geralmente visível na região dos 400 aos 600 nm [47]. No entanto, como já abordado, se ocorrer dopagem por parte de agentes aceitadores de eletrões, existe a formação de estados de polarão ou bipolarão (PEDOT^+ ou PEDOT^{2+}) que correspondem a estados oxidados do PEDOT, com a perda de um ou dois eletrões, respetivamente, em que a condutividade do polímero é aumentada. A formação de estados de polarão ocorre por oxidação do polímero com FeCl_3 , com os iões de cloro (Cl^-) a desempenhar o papel de dopante ou por oxidação com o APS, em que os iões sulfato atuam como contra-íões, como se pode observar na figura 3.19. Os estados de polarão são detetados em espectros de absorvância de UV-vis IR por picos absorção com máximos a 900 nm (PEDOT^+) e 1250 nm (PEDOT^{2+}) ao passo que o estado neutro exibe um máximo por volta dos 600 nm [85]. O desenvolvimento do pico de absorção associado à formação do polarão (PEDOT^+) já pode ser observado algures entre os 600 e os 900 nm (banda de transferência de cargas para polímeros condutores) [47].

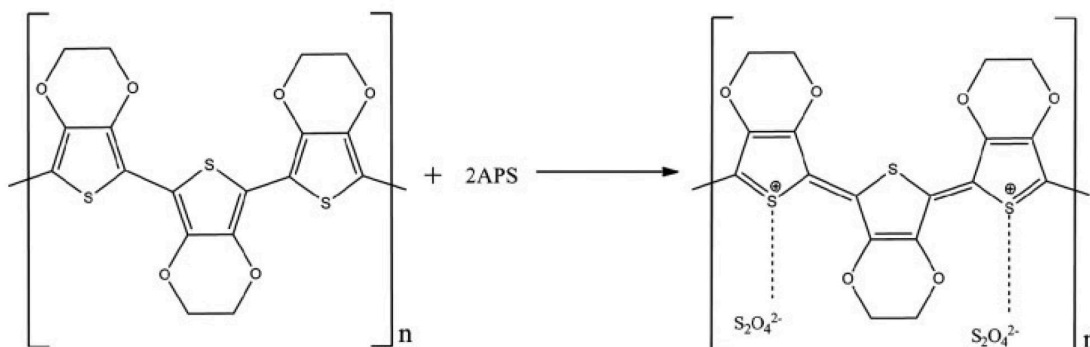
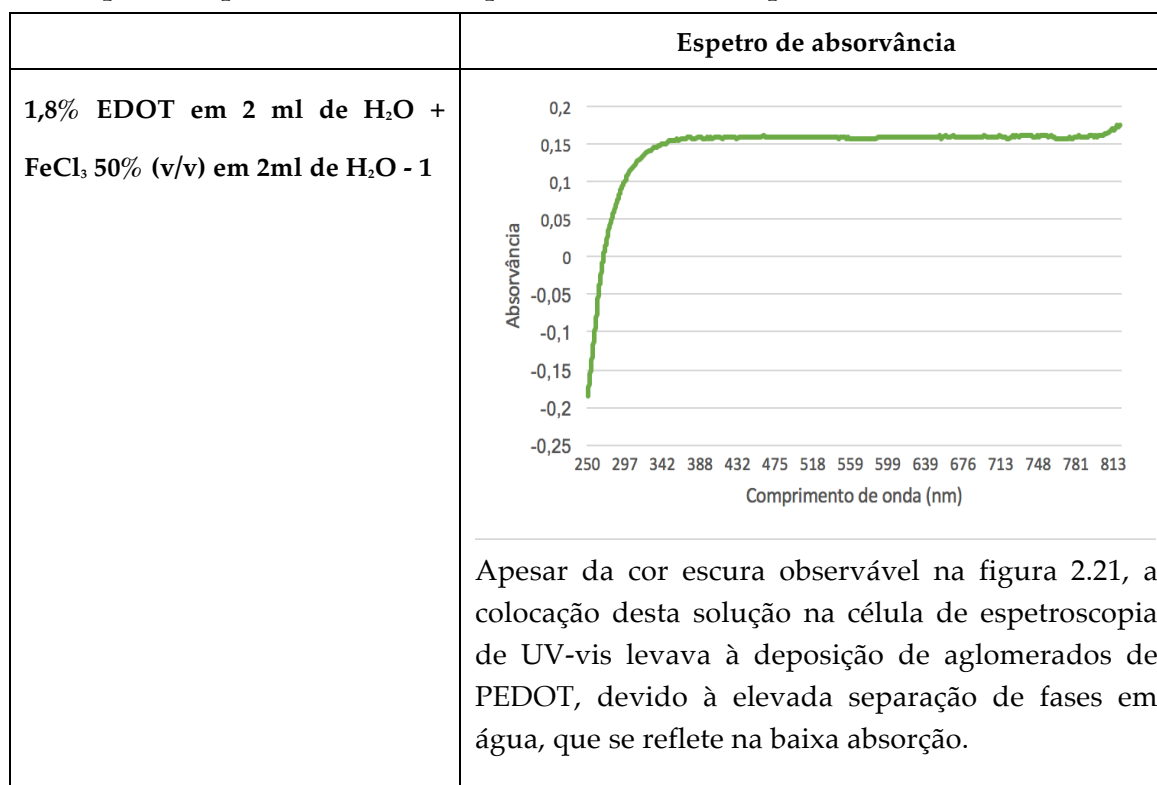
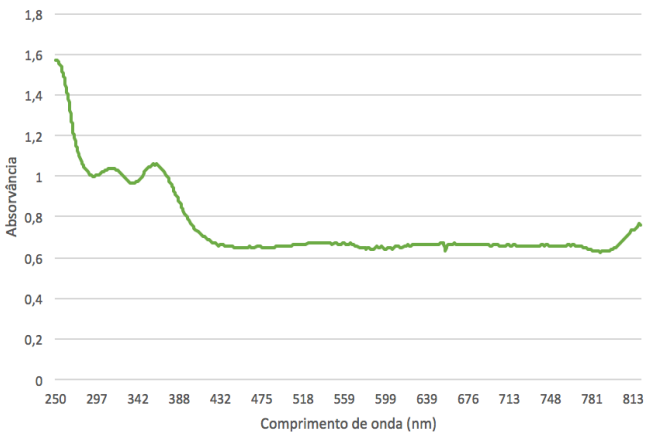
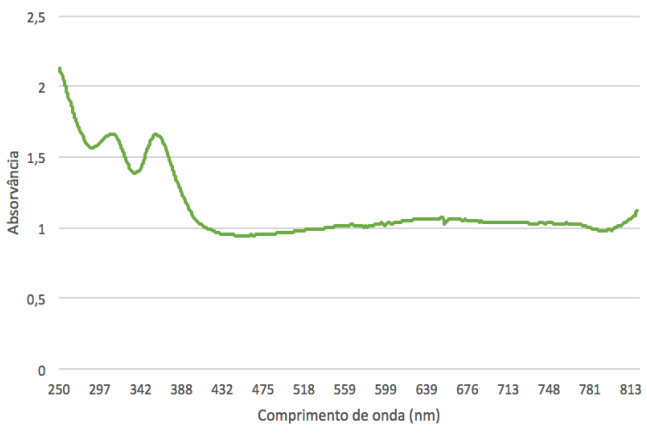


Figura 3.19 - Mecanismo de dopagem do PEDOT com APS, em que os íões sulfato $S_2O_4^{2-}$ atuam como aceptadores de eletrões (adaptado [90]).

Em seguida, na figura 3.20, apresentam-se os espectros de absorvância obtidos para as quatro soluções de polimerização sem quitosano.



<p>1,8% EDOT em 2 ml de ETOH + FeCl₃ 50% (v/v) em 2ml de ETOH - 2</p>	 <p>Nesta solução etanoica de PEDOT, são observáveis picos de absorção a 250, 315 e 370 nm e uma banda de absorvância a começar perto dos 460 nm. É observável a existência de um polarão nessa zona. Comparativamente às figuras 3.17 e 3.18, são notórias as semelhanças, a tonalidade é azul escura, absorvendo mais na gama dos 380 nm. A presença de EDOT na solução pode resultar na alteração do espectro de absorção do PEDOT, para comprimentos de onda mais pequenos. “Puxando” o gráfico para a esquerda.</p>
<p>1,8% EDOT em 2 ml de AcAc glacial + FeCl₃ 50% (v/v) em 2ml de AcAc glacial - 3</p>	 <p>Nesta solução é notória uma deslocalização, para comprimentos de onda mais altos, do espectro de absorção do PEDOT. A cor da solução é visivelmente mais escura que a solução anterior (vide figura 2.21), o que é observável pela variação da intensidade dos picos de absorvância. Dos 375 aos 620 nm é observável uma larga banda de absorção, que indica a dopagem do polímero pela formação do dito polarão. Neste gráfico acentua-se a dopagem do</p>

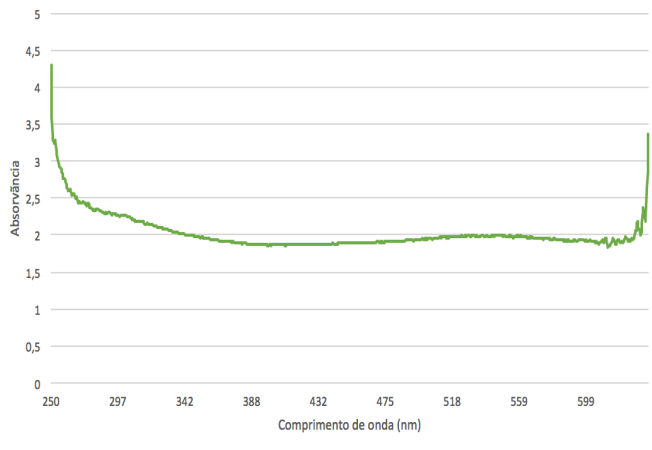
	polímero, tratando-se de uma reação quase imediata, visível pela transição de cores.
1,8% EDOT em 2 ml de AcAc 45% (v/v) + FeCl ₃ 50% (v/v) em 2ml de ETOH - 4	 <p>Esta última condição pretendeu recriar a reação de polimerização que se dá com o quitosano, num meio ácido menos concentrado que o ácido acético glacial. Neste espectro de absorvância distingue-se uma larga banda de absorvância entre os 500 e os 800 nm, uma vez mais associada à formação do polarão.</p>

Figura 3.20 - Espectro de absorvância UV-vis dos diferentes meios de polimerização estudados.

3.6 Análise dos resultados de FTIR

O objetivo da espectroscopia FT-IR consistiu na análise da composição química dos filmes de PEDOT, sendo possível observar se existiria possíveis vestígios de oxidante. Foram obtidos espectros em modo de transmitância ou absorvância para os cinco filmes testados.

Na figura 3.21 é observável o espectro de transmitância do filme de quitosano obtido a partir de uma solução a 4% em ácido acético a 2% com 0,4% de PEO. Facilmente se identificam as bandas e picos presentes neste espectro com os dos espectros apresentados nas figuras 3.22 e 3.23 que reportam dados da literatura.

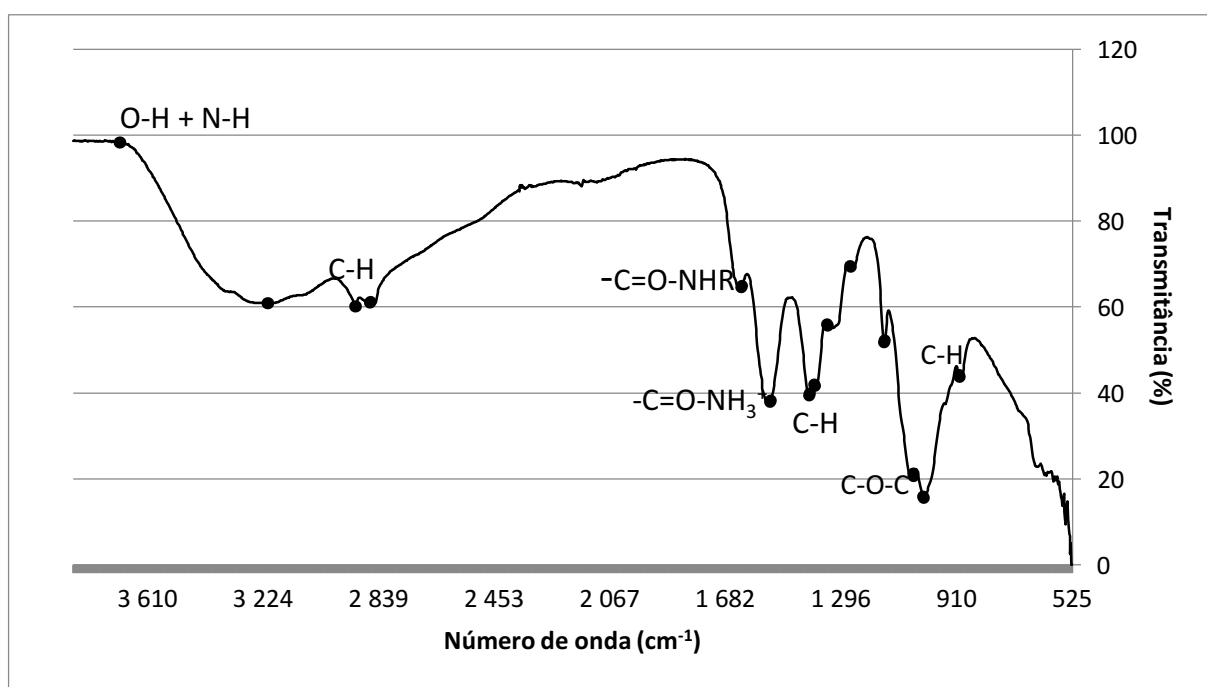


Figura 3.21 - Espectro FTIR de amostra-controlo de filme de quitosano 4% dissolvido em 2% (v/v) de ácido acético.

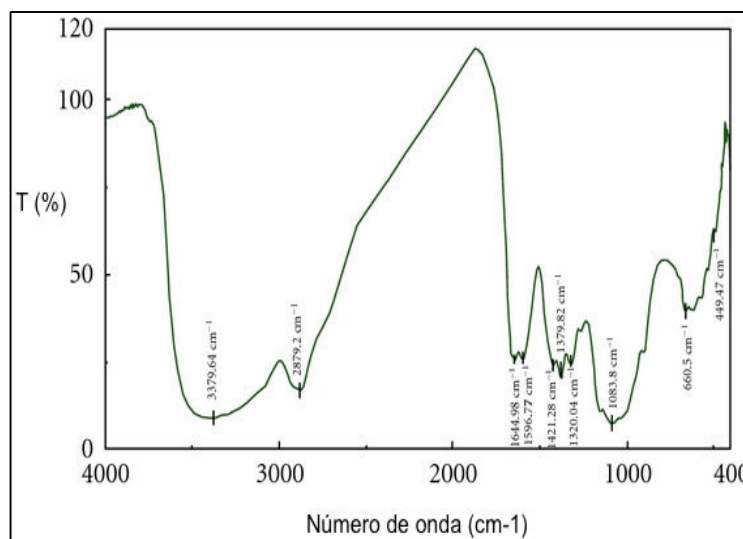


Figura 3.22 - Espectro FTIR de quitosano presente na literatura (adaptado [91]).

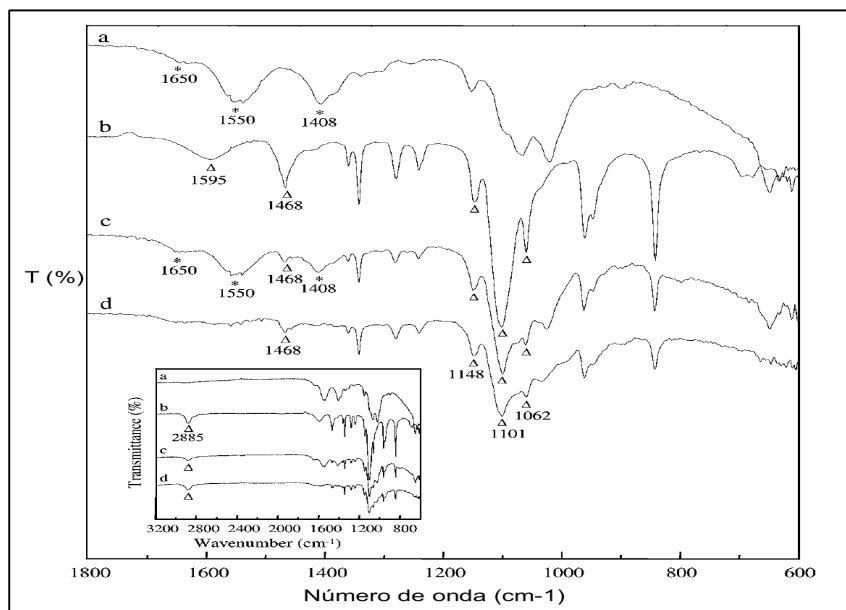


Figura 3.23 - Nesta figura é possível observar os espectros de FTIR de um filme de quitosano 4% em 2% (v/v) ácido acético (a), de PEO 4% em 2% (v/v) ácido acético (b), a mistura de ambos na proporção 1:1 (c) e de microfibras eletrofiadas (d) a partir da mesma mistura. Os picos marcados com '*' indicam a presença de quitosano e os picos marcados a 'Δ' indicam a presença de PEO (adaptado [92]).

No espectro FTIR do filme de quitosano, figura 3.21, é possível observar os picos e bandas características deste polímero: picos perto de 3300 cm^{-1} (estiramento de O-H e N-H), 2920 cm^{-1} (estiramento do C-H nos grupos $-\text{CH}_2$ e $-\text{CH}_3$), 1655 cm^{-1} (estiramento do C=O da amida primária), 1590 cm^{-1} (dobramento do $-\text{NH}_2$ e banda da amida secundária, estiramento do C-N e dobramento do N-H), e as bandas a 1175 cm^{-1} (estiramento assimétrico C-O-C) e 1045 cm^{-1} (estiramento C-O), características da cadeia primária do polissacarídeo [86].

Na tabela 3.9 apresenta-se a correspondência estabelecida entre os picos observados na figura 3.21 e os modos vibracionais que lhes correspondem na literatura.

Tabela 3.9 - Atribuição do significado dos picos de absorvância observados na figura 3.18, em paralelo com o estipulado na literatura (adaptado[87]).

Banda de absorção IR (cm ⁻¹) - literatura	Significado	Banda de absorção IR (cm ⁻¹) - real
3750-3000	Vibração de estiramento associada ao grupo O-H sobreposta com a vibração de estiramento simétrico do grupo N-H.	3700-3213
2920	Vibração de estiramento assimétrico do grupo C-H.	2927
2875	Vibração de estiramento simétrico do grupo C-H.	2891
1645	Vibração de estiramento do grupo -C=O-NHR (amida secundária).	1649
1574	Vibração de estiramento do grupo -C=O-NH ₃ ⁺ (amina protonada).	1551
1426,1375	Vibração de dobramento dos grupos C-H	1402,1385
1313	Vibração de estiramento simétrico do grupo C-H ₃ (amida terciária).	1342
1261	Vibração de estiramento do grupo C-O-H.	1267
1150, 1065, 1024	Vibração de estiramento assimétrico e vibração de estiramento simétrico do grupo C-O-C. Característico da estrutura sacarídea do CS, atribuída às vibrações do anel polissacarídeo.	1151,1068,1026
890	Vibração do grupo C-H	887

Em seguida, na figura 3.24, apresentam-se os espectros de FTIR para as quatro amostras de filmes que contêm CS e PEO e CS/PEDOT, correspondente às quatro condições de obtenção do CS/PEDOT.

Na figura 3.25 observa-se os três picos principais do PEDOT associados ao anel de tiofeno, de acordo com diferentes literaturas, que se situam igualmente entre os 1350 e os 1490 cm^{-1} [36].

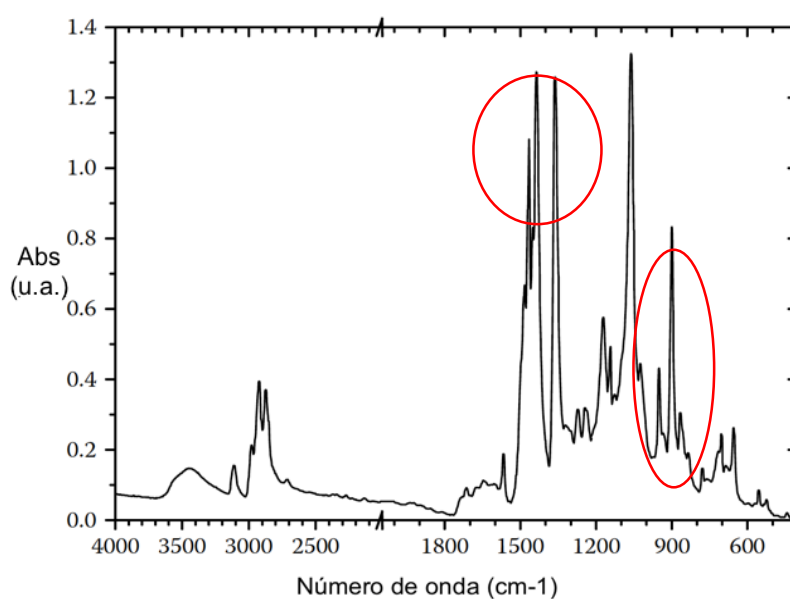
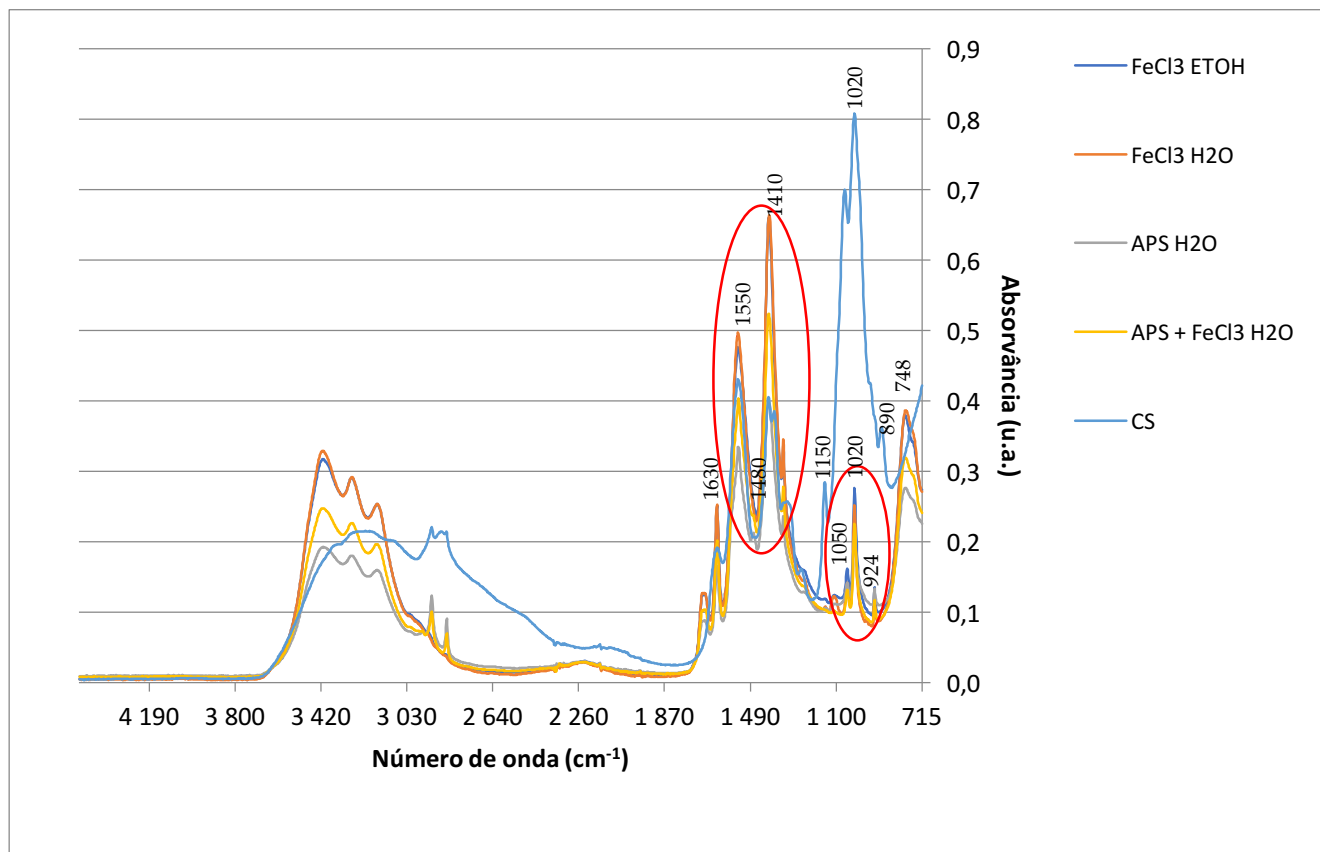


Figura 3.24 - Espetros FTIR de PEDOT neutro e não-dopado, obtido através de polimerização com FeCl₃ (adaptado [36]).

Na figura 3.26 apresenta-se o espectro FT-IR do monómero de EDOT, cujos principais picos se encontram a cerca de 754/764, 890/892, 1185/1186 e 1480/1487 cm^{-1} [36][88].

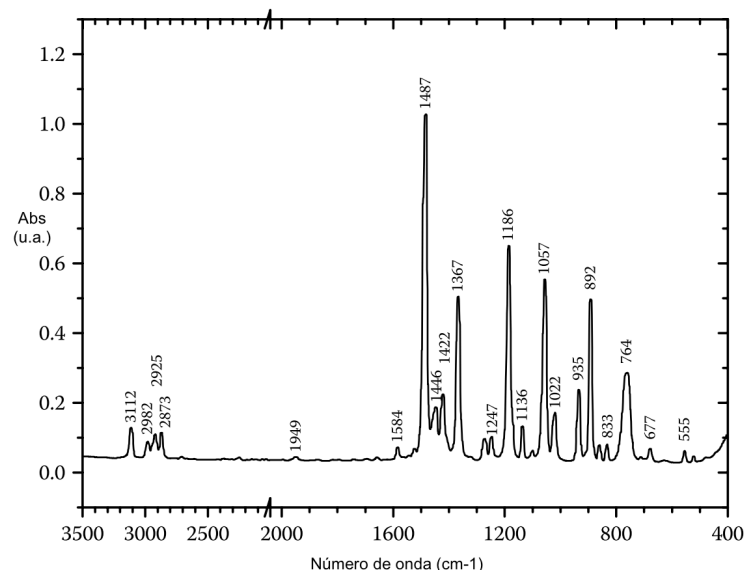


Figura 3.25 – Espectro FTIR de EDOT (adaptado [36]).

As variações no espectro do quitosano (CS) com a adição do PEO devem-se à formação de pontes de hidrogénio entre o oxigénio do grupo poliéter do PEO e o hidrogénio do grupo amina do quitosano. Os picos associados à vibração de estiramento do grupo C-O-C surgem a 1148 e a 1062 cm^{-1} e o pico a 2880 cm^{-1} , deve-se à frequência de vibração do grupo CH_2 do PEO.

O fato de não serem visíveis, para as quatro condições de polimerização, na figura 3.24, as influências destes picos, como ocorre no gráfico CS, permite inferir que todo o PEO adicionado à reação de polimerização, foi, mais tarde, retirado com as lavagens antes da produção dos filmes, enquanto que o filme de CS “acusa” os 0,4% de PEO.

Paras as quatro condições, os três picos a 1340, 1410 e 1480 cm^{-1} estão associados aos diferentes modos de vibração do anel de tiofeno: estiramento antissimétrico C=C, estiramento simétrico C=C e estiramento da ligação C-C, respetivamente. As bandas a 940, 902 e 826 cm^{-1} estão associadas à ligação C-S do anel de tiofeno. A 748 cm^{-1} é observável o pico associado à vibração da deformação dentro e fora do plano do grupo =C-H do EDOT. É identificável, nos quatro gráficos das amostras de filme, o espectro típico do PEDOT, com a influ-

ência do espectro do CS que resulta numa ligeira deformação e translação dos picos do PEDOT para números de onda superiores [88]. São visíveis os picos do CS a 1550 e 1630 cm^{-1} relativos às amidas primárias e secundárias, respetivamente e os picos a 924, 1020 e 1050 cm^{-1} estão associados à estrutura polissacarádea do híbrido CS/PEDOT.

Neste gráfico, existe até sobreposição entre as condições de oxidação com FeCl_3 em etanol e FeCl_3 em H_2O , pelo que o solvente não influencia a absorvância do polímero. Ainda que os valores de absorvância variem entre oxidantes, os picos ocorrem à mesma frequência, formando-se um padrão associado ao espectro do PEDOT. Pelo que se supõe que o oxidante apenas influencia a reação de formação de PEDOT, sendo o FeCl_3 mais eficaz, não existindo influência destes no espectro em si. Deste modo, as lavagens mostraram-se suficientes e adequadas para a remoção vestigial dos oxidantes citotóxicos.

3.7 Teste de citotoxicidade

Um dia após a adição dos extratos dos híbridos CS/PEDOT a células em cultura, foi efetuado o teste de viabilidade celular que permitiu comparar a viabilidade das células expostas a diferentes concentrações de extrato, comparativamente à viabilidade das células em controlos (negativo de citotoxicidade - células encubadas em DMEM completo - e positivo de citotoxicidade - células encubadas em DMEM completo ao qual se adicionou 10% de DMSO). Os resultados encontram-se apresentados na figura 3.27.

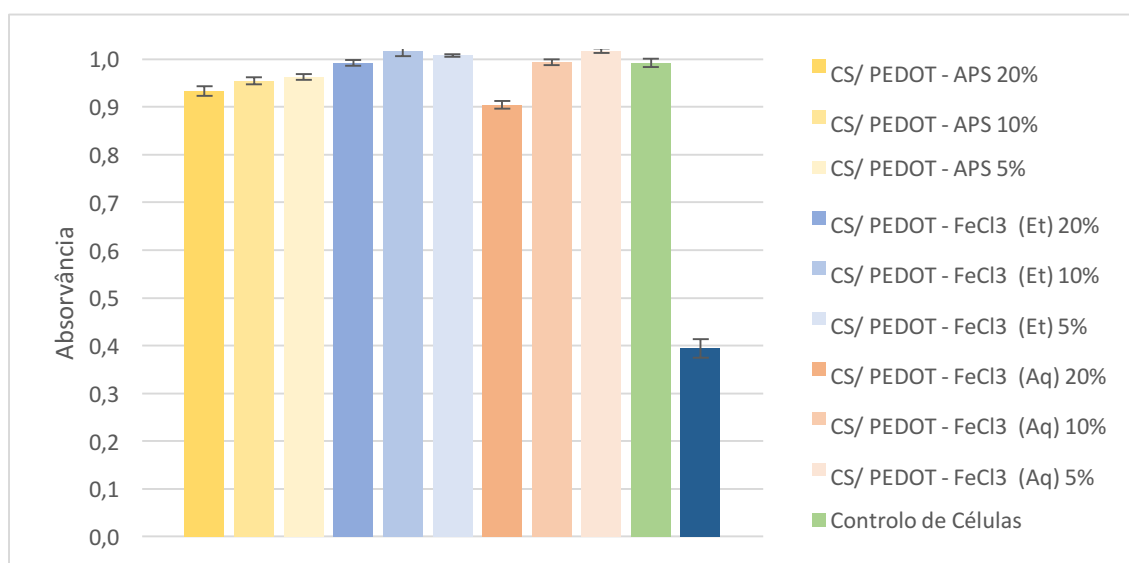


Figura 3.26 – Representação gráfica da viabilidade celular de células Vero, encubadas por 24 h em extratos, com diferentes concentrações, obtida através do teste colorimétrico de resazurina. As absorvâncias encontram-se normalizadas à do controlo de células (CC).

Na representação gráfica da viabilidade celular, figura 3.27, a altura das colunas indica os valores médios de absorvância e as barras de erro indicam as respetivas incertezas calculadas pela propagação dos desvios-padrão experimentais.

As elevadas absorvâncias demonstram que os extratos produzidos a partir dos três híbridos testados são não-citotóxicos para as células. Uma elevada absorvância significa que existiu processamento metabólico pelas células e consequente redução da resazurina a resorufina, pela diferença de máximos de absorvância a 570 nm e 600 nm. Na globalidade, as situações correspondentes à utilização de APS demonstraram piores resultados que as correspondentes à utilização de FeCl_3 , sendo que as menores concentrações se mostraram naturalmente menos citotóxicas. As situações correspondentes à utilização de FeCl_3 em etanol demonstraram os melhores resultados de viabilidade celular, sendo que para 20% (m/v) a absorvância foi igual à do controlo negativo de citotoxicidade. Para as demais concentrações, de 10% e 5% (m/v), existiu até um aumento de absorvância.

No controlo positivo de citotoxicidade, com DMSO, testou-se a veracidade do teste de resazurina. Por observação microscópica pode verificar-se (figura 3.28) que neste controlo ocorreu morte celular. Por comparação com o con-

trolo negativo (figura 3.29) podemos verificar que apenas algumas células se encontram aderidas.

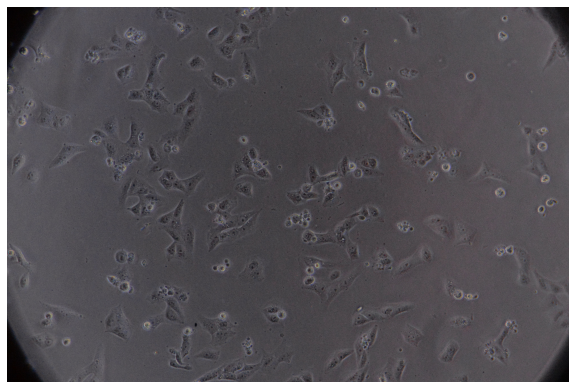


Figura 3.27 – Controlo positivo de células epiteliais em meio com 10% (v/v) DMSO com ampliação de 200x.

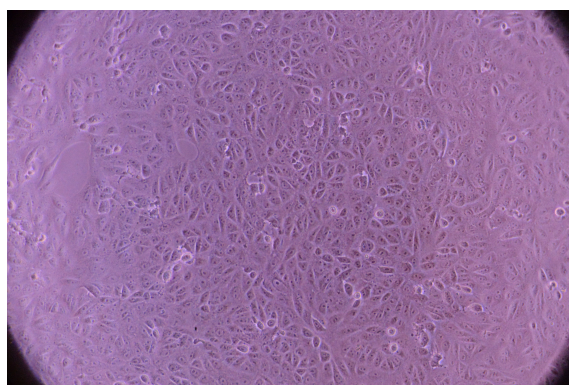


Figura 3.28 – Controlo negativo de células epiteliais em meio sem DMSO com ampliação de 200x.

Ainda por observação microscópica, confirmou-se que as células expostas aos extratos se encontram aderidas e em densidades compatíveis com os resultados do teste colorimétrico. Pode ainda constatar-se que, para alguns extratos, ocorreu depósito de partículas sobre a camada de células e que esta diminui com a diminuição da concentração do extrato.

Nas figuras 3.30, 3.31 e 3.32 é possível observar a visualização das células ao MO para as várias condições testadas.

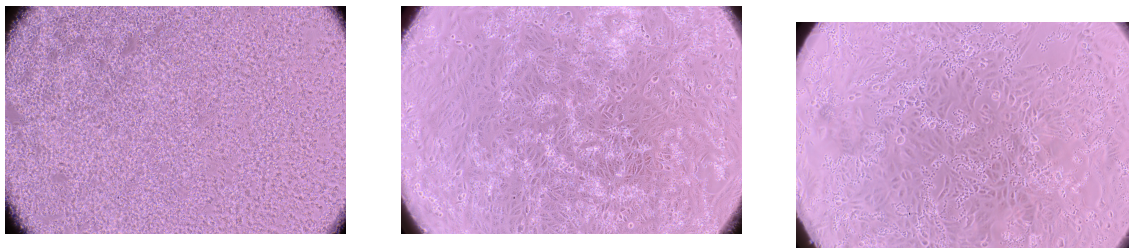


Figura 3.29 - Imagem de MO de células epiteliais em meio condicionado de PEDOT a 20%, 10% e 5% (v/v), respectivamente, da esquerda para a direita, obtido por oxidação com APS, com ampliação de 200x.

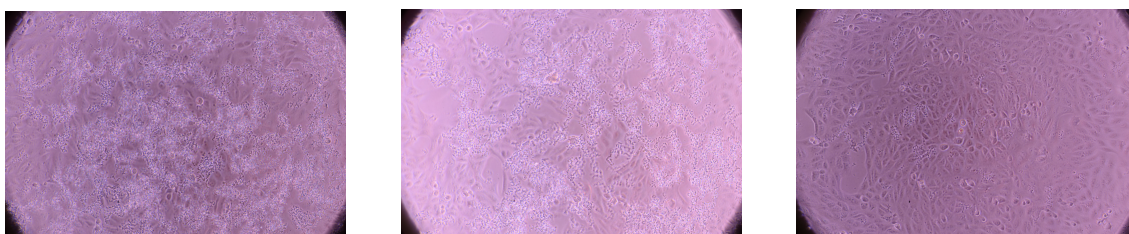


Figura 3.30 - Imagem de MO de células epiteliais em meio condicionado de PEDOT a 20%, 10% e 5% (v/v), respectivamente, da esquerda para a direita, obtido por oxidação com FeCl₃ em H₂O, com ampliação de 200x.

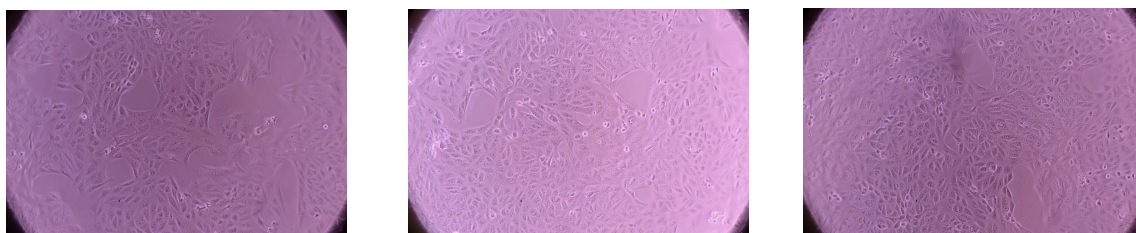


Figura 3.31 - Imagem de MO de células epiteliais em meio condicionado de PEDOT a 20%, 10% e 5% (v/v), respectivamente, da esquerda para a direita, obtido por oxidação com FeCl₃ em ETOH, com ampliação de 200x.

No caso da situação correspondente à utilização FeCl₃ dissolvido em etanol não é visível qualquer depósito. O ambiente químico que se estabelece aquando da oxidação com FeCl₃ em etanol demonstra ser diferente que o FeCl₃ em água e que o APS em água, afetando a citotoxicidade do PEDOT que se forma. Assim se conclui que, para possíveis estudos futuros, o oxidante a utilizar deve ser o FeCl₃ em etanol, em detrimento de outras misturas de oxidantes.

4 Conclusões e Perspetivas Futuras

Um dos objetivos deste trabalho foi atingido com a síntese em laboratório de PEDOT através da sua polimerização química em solução. Para tal, testaram-se diferentes soluções oxidantes com persulfato de amónia e cloreto de ferro (III) hexahidratado.

Depois de sintetizados e devidamente preparados, os híbridos foram adicionados a soluções ácidas de quitosano, de onde se produziram matrizes de nanofibras por eletrofiação. Das mesmas soluções se fizeram filmes e ambas as estruturas foram avaliadas quanto à condutividade. A medição da condutividade dos filmes permite atribuir um valor de condutividade realístico ao polímero condutor em si, mais do que à estrutura, complementando a medição da condutividade das nanofibras.

Das deposições também se recolheram amostras alinhadas de nanofibras dos diferentes híbridos que, futuramente, seria interessante utilizar em estudos de proliferação e adesão celular.

A visualização por espectroscopia UV-vis possibilitou a identificação do processo concreto de dopagem com o ião Cl^- e com o ião sulfato $\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$, a formação de polarões eletrónicos e como regular a condutividade do PEDOT através da absorção do polímero nos diferentes meios. Assim, uma maior quantidade de oxidante resultaria numa maior dopagem e maior condutividade, para o mesmo tempo de reação. Num estudo futuro, a reação de polimerização em etanol poderia ser feita com uma maior quantidade de EDOT, aumentando a proporção monómero: oxidante para 3:1. Futuramente, seria in-

interessante acompanhar a reação de polimerização por UV-vis em intervalos regulares de tempo.

A análise por FTIR permitiu observação das vibrações características do PEDOT, da influência do quitosano no espectro e identificação de grupos químicos constituintes do polímero condutor.

Os testes de substrato para as três *pellets* demonstraram que o PEDOT revela uma baixa citotoxicidade, existindo viabilidade celular para todas as condições. Para o FeCl_3 em etanol existe adesão e proliferação celular a 10% e 5% (m/v) uma vez que os resultados se mostram superiores a uma absorvância máxima de 1 (controle).

Para todos os testes realizados, o FeCl_3 em etanol mostrou ser um oxidante mais eficaz, eficiente e biocompatível. A reação é mais rápida, a condutividade é superior e a citotoxicidade é mais baixa que os demais oxidantes.

Com as amostras de nanofibras e filmes seria importante o estudo concreto do efeito da condutividade na regeneração do tecido medular, através da infiltração celular nos *scaffolds* produzidos. Aliando a elevada razão área/volume das nanofibras e uma topografia orientada e capaz de direcionar o crescimento de neurites em células neuronais.

A condutividade das nanofibras ($1,03 \mu\text{S}/\text{cm}$) e dos filmes ($300 \mu\text{S}/\text{cm}$) mostrou-se muito interessante para a futura análise da sua adesão e proliferação celulares, explorando o conceito de dopagem. O estudo poderia ser alargado para a estimulação elétrica dessas nanofibras de CS com PEDOT (oxidante: FeCl_3 em etanol), semeado com células da linha celular neuronal. A utilização conjunta de filmes e nanofibras poderia ser um bom ponto de partida para a criação de um protótipo de uma conduta neuronal, com base no trabalho de Ana Fradinho [80].

5 Referências Bibliográficas

1. Silva, N.A., Sousa, N., Reis, R.L., Salgado, A.J.: From basics to clinical: A comprehensive review on spinal cord injury. *Prog. Neurobiol.* 114, 25–57 (2014).
2. Subramanian, A., Krishnan, U.M., Sethuraman, S.: Development of biomaterial scaffold for nerve tissue engineering: Biomaterial mediated neural regeneration. *J. Biomed. Sci.* 16, 108 (2009).
3. Assunção-Silva, R.C., Gomes, E.D., Sousa, N., Silva, N.A., Salgado, A.J.: Hydrogels and Cell Based Therapies in Spinal Cord Injury Regeneration, <http://www.hindawi.com/journals/sci/2015/948040/>, (2015).
4. Madigan, N.N., McMahon, S., O'Brien, T., Yaszemski, M.J., Windebank, A.J.: Current tissue engineering and novel therapeutic approaches to axonal regeneration following spinal cord injury using polymer scaffolds. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 169, 183–99 (2009).
5. Kehoe, S., Zhang, X.F., Boyd, D.: FDA approved guidance conduits and wraps for peripheral nerve injury: A review of materials and efficacy. *Injury.* 43, 553–572 (2012).
6. Li, W.J., Laurencin, C.T., Caterson, E.J., Tuan, R.S., Ko, F.K.: Electrospun nanofibrous structure: A novel scaffold for tissue engineering. *J. Biomed. Mater. Res.* 60, 613–621 (2002).
7. Ahlborn, P., Schachner, M., Irintchev, A.: One hour electrical stimulation accelerates functional recovery after femoral nerve repair. *Exp. Neurol.* 208, 137–144 (2007).
8. Alrashdan, M.S., Park, J.-C., Lee, J.-H., Sung, M.-A., Yoo, S.B., Jahng, J.W., Lee, T.H., Kim, S.-J.: Thirty minutes of low intensity electrical stimulation promotes nerve regeneration after sciatic nerve crush injury in a rat model. 110, 168–179 (2010).
9. Elzinga, K., Tyreman, N., Ladak, A., Savaryn, B., Olson, J., Gordon, T.: Regular Article: Brief electrical stimulation improves nerve regeneration after delayed repair in Sprague Dawley rats. 269 OP-I, 142 (2015).

10. Al-Majed, A.A., Neumann, C.M., Gordon, T., Brushart, T.M.: Brief electrical stimulation promotes the speed and accuracy of motor axonal regeneration. *20*, 2602–2608 (2000).
11. Huang, J., Lu, L., Zhang, J., Hu, X., Zhang, Y., Liang, W., Wu, S., Luo, Z.: Electrical stimulation to conductive scaffold promotes axonal regeneration and remyelination in a rat model of large nerve defect. *PLoS One*. *7*, (2012).
12. Wang, M., Zhai, P., Chen, X., Schreyer, D.J., Sun, X., Cui, F.: Bioengineered scaffolds for spinal cord repair. *Tissue Eng. Part B. Rev.* *17*, 177–194 (2011).
13. Kirkpatrick, L., Brady, S.: Molecular Components of the Neuronal Cytoskeleton. In: *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*. 6th edition. Lippincott-Raven (1999).
14. Yuan, A., Rao, M. V, Veeranna, Nixon, R.A.: Neurofilaments at a glance. *J. Cell Sci.* *125*, 3257–3263 (2012).
15. Ouyang, H., Nauman, E., Shi, R., Fletcher, D., Mullins, R., Baas, P., Ahmad, F., Ahmad, F., Hughey, J., Wittmann, T., Hyman, A., Greaser, M., Baas, P., Kolodney, M., Elson, E., Hirose, M., Ishizaki, T., Watanabe, N., Uehata, M., Kranenburg, O., Moolenaar, W., Matsumura, F., Maekawa, M., Bito, H., Narumiya, S., Waterman-Storer, C., Salmon, E., Waterman-Storer, C., Worthylake, R., Liu, B., BurrIDGE, K., Salmon, E., Greene, L., Tischler, A., Dennerll, T., Joshi, H., Steel, V., Buxbaum, R., Heidemann, S., Bernal, R., Pullarkat, P., Melo, F., Helfand, B., Mendez, M., Pugh, J., Delsert, C., Goldman, R., Puech, P., Taubenberger, A., Ulrich, F., Krieg, M., Muller, D., Heisenberg, C., Radmacher, M., Fritz, M., Kacher, C., Cleveland, J., Hansma, P., Wojcikiewicz, E., Zhang, X., Moy, V., Rotsch, C., Braet, F., Wisse, E., Radmacher, M., Smith, C., Jordan, M., Wilson, L., Tang-Schomer, M., Patel, A., Baas, P., Smith, D., Forscher, P., Smith, S., Hay, M., Boni, U. De, Sager, P., Wang, N., Goldsmith, W., Johnson, K., Raman, A., Trigueros, S., Cartagena, A., Stevenson, A., Susilo, M., Nauman, E., Contera, S.A., Lin, D., Shreiber, D., Dimitriadis, E., Horkay, F., Ouyang, H., Sun, W., Fu, Y., Li, J., Cheng, J., Nauman, E., Shi, R.: Contribution of cytoskeletal elements to the axonal mechanical properties. *J. Biol. Eng.* *7*, 21 (2013).
16. Widmaier, E.P., Raff, H., Strang, K.T.: *Vander's Human Physiology: The mechanisms of Body Function*. McGraw-Hill (2014).
17. Shier, D., Hole, J.W., Butler, J., Lewis, R.: *Hole's Human Anatomy & Physiology*. McGraw-Hill (2002).
18. Yiu, G., He, Z.: Glial inhibition of CNS axon regeneration. *Nat. Rev. Neurosci.* *7*, 617–627 (2006).
19. Schmidt, C.E., Leach, J.B.: Neural Tissue Engineering: Strategies for Repair and Regeneration. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* *5*, 293–347 (2003).
20. Fawcett, J.W.: Bridging spinal cord injuries. *J. Biol.* *7*, 25 (2008).
21. Tello, J.F.: La influencia del neurotropismo en la regeneración de los centros nerviosos. *Trab. Lab. Invest. Biol.* 123–159 (1911).

22. Cotman, C.W.: Regeneration. In: Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects. 6th edition. Lippincott-Raven (1999).
23. Taylor, J.: Brain damage and repair – From molecular research to clinical therapy. Kluwer Academic Publishers (2008).
24. Selzer, M.E.: Textbook of neural repair and rehabilitation. Cambridge University Press (2006).
25. Thuret, S., Moon, L.D.F., Gage, F.H.: Therapeutic interventions after spinal cord injury. *Nat. Rev. Neurosci.* 7, 628–643 (2006).
26. Klapka, N., Müller, H.: Collagen matrix in spinal cord injury. *J. Neurotrauma.* 23, 422–435 (2006).
27. Midha, R., Munro, C.A., Dalton, P.D., Tator, C.H., Shoichet, M.S.: Growth factor enhancement of peripheral nerve regeneration through a novel synthetic hydrogel tube. *J. Neurosurg.* 99, 555–65 (2003).
28. Labrador, R.O., Butí, M., Navarro, X.: Influence of Collagen and Laminin Gels Concentration on Nerve Regeneration after Resection and Tube Repair. *Exp. Neurol.* 149, 243–252 (1998).
29. Weng, B., Diao, J., Xu, Q., Liu, Y., Li, C., Bo Weng, A., Ding, A., Chen, J., Ding, J., Jun Chen, A.: Bio-interface of conducting polymer-based materials for neuroregeneration.
30. Hetzler, L.E.T., Sharma, N., Tanzer, L., Wurster, R.D., Leonetti, J., Marzo, S.J., Jones, K.J., Foecking, E.M.: Accelerating functional recovery after rat facial nerve injury: Effects of gonadal steroids and electrical stimulation. *Otolaryngol. Head. Neck Surg.* 139, 62–67 (2008).
31. Ravichandran, R., Sundarrajan, S., Venugopal, J.R., Mukherjee, S., Ramakrishna, S.: Applications of conducting polymers and their issues in biomedical engineering. *J. R. Soc. Interface.* 7 Suppl 5, S559-79 (2010).
32. Lefebvre, M., Qi, Z., Rana, D., Pickup, P.G.: Chemical Synthesis, Characterization, and Electrochemical Studies of Poly(3,4-ethylenedioxythiophene)/ Poly(styrene-4-sulfonate) Composites.
33. Shi, G., Rouabhia, M., Meng, S., Zhang, Z.: Electrical stimulation enhances viability of human cutaneous fibroblasts on conductive biodegradable substrates. *J. Biomed. Mater. Res. - Part A.* 84, 1026–1037 (2008).
34. Pires, F., Ferreira, Q., Rodrigues, C.A. V, Morgado, J., Ferreira, F.C.: Neural stem cell differentiation by electrical stimulation using a cross-linked PEDOT substrate: Expanding the use of biocompatible conjugated conductive polymers for neural tissue engineering. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1850, 1158–1168 (2015).
35. Moroder, P., Runge, M.B., Wang, H., Ruesink, T., Lu, L., Spinner, R.J., Windebank, A.J., Yaszemski, M.J.: Material properties and electrical stimulation regimens of polycaprolactone fumarate-polypyrrole scaffolds as potential conductive nerve conduits. *Acta Biomater.* 7, 944–953 (2011).
36. Elschner, A.: PEDOT: principles and applications of an intrinsically conductive polymer. CRC Press, Boca Raton, FL (2011).
37. Bhardwaj, N., Kundu, S.C.: Electrospinning: A fascinating fiber

- fabrication technique. *Biotechnol. Adv.* 28, 325–347 (2010).
38. Ghasemi-Mobarakeh, L., Prabhakaran, M.P., Morshed, M., Nasr-Esfahani, M.H., Ramakrishna, S.: Electrical Stimulation of Nerve Cells Using Conductive Nanofibrous Scaffolds for Nerve Tissue Engineering. *Tissue Eng. Part A.* 15, 3605–3619 (2009).
 39. Lee, J.Y., Bashur, C.A., Goldstein, A.S., Schmidt, C.E.: Polypyrrole-coated electrospun PLGA nanofibers for neural tissue applications. *Biomaterials.* 30, 4325–4335 (2009).
 40. del Valle, L.J., Aradilla, D., Oliver, R., Sepulcre, F., Gamez, A., Armelin, E., Alemán, C., Estrany, F.: Cellular adhesion and proliferation on poly(3,4-ethylenedioxythiophene): Benefits in the electroactivity of the conducting polymer. *Eur. Polym. J.* 43, 2342–2349 (2007).
 41. Abidian, M.R., Kim, D.H., Martin, D.C.: Conducting-polymer nanotubes for controlled drug release, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21552389>, (2006).
 42. Abidian, M.R., Corey, J.M., Kipke, D.R., Martin, D.C.: Conducting-polymer nanotubes improve electrical properties, mechanical adhesion, neural attachment and neurite outgrowth of neural electrodes. *Small.* 6, 421–429 (2010).
 43. Abidian, M.R., Daneshvar, E.D., Egeland, B.M., Kipke, D.R., Cederna, P.S., Urbanchek, M.G.: Hybrid Conducting Polymer-Hydrogel Conduits for Axonal Growth and Neural Tissue Engineering. *Adv. Healthc. Mater.* 1, 762–767 (2012).
 44. Feng, Z.Q., Wu, J., Cho, W., Leach, M.K., Franz, E.W., Naim, Y.I., Gu, Z.Z., Corey, J.M., Martin, D.C.: Highly aligned poly(3,4-ethylene dioxythiophene) (PEDOT) nano- and microscale fibers and tubes. *Polym. (United Kingdom).* 54, 702–708 (2013).
 45. Li, Y. ed: *Organic Optoelectronic Materials*. Springer International Publishing, Cham (2015).
 46. Le, T.-H., Kim, Y., Yoon, H.: Electrical and Electrochemical Properties of Conducting Polymers. *Polymers (Basel).* 9, 150 (2017).
 47. Park, B.W., Yang, L., Johansson, E.M.J., Vlachopoulos, N., Chams, A., Perruchot, C., Jouini, M., Boschloo, G., Hagfeldt, A.: Neutral, polaron, and bipolaron states in pedot prepared by photoelectrochemical polymerization and the effect on charge generation mechanism in the solid-state dye-sensitized solar cell. *J. Phys. Chem. C.* 117, 22484–22491 (2013).
 48. Yamamoto, T., Abla, M.: Synthesis of non-doped poly(3,4-ethylenedioxythiophene) and its spectroscopic data. *Synth. Met.* 100, 237–239 (1999).
 49. Aasmundtveit, K.E., Samuelsen, E.J., Pettersson, L.A.A., Inganäs, O., Johansson, T., Feidenhans'l, R.: Structure of thin films of poly(3,4-ethylenedioxythiophene). *Synth. Met.* 101, 561–564 (1999).
 50. Aleshin, A.N., Williams, S.R., Heeger, A.J.: Transport properties of

- poly(3,4-ethylenedioxythiophene)/poly(styrenesulfonate). *Synth. Met.* 94, 173–177 (1998).
51. Martens, H.C.F., Reedijk, J.A., Brom, H.B., De Leeuw, D.M., Menon, R.: The metallic state in disordered quasi-one-dimensional conductors. *Phys. Rev. B.* 63, 4 (2000).
 52. Balint, R., Cassidy, N.J., Cartmell, S.H.: Conductive polymers: Towards a smart biomaterial for tissue engineering. *Acta Biomater.* 10, 2341–2353 (2014).
 53. Bendrea, A.-D., Cianga, L., Cianga, I.: Review paper: progress in the field of conducting polymers for tissue engineering applications. (2011).
 54. Sui, L., Zhang, B., Wang, J., Cai, A.: Polymerization of PEDOT/PSS/Chitosan-Coated Electrodes for Electrochemical Bio-Sensing. *Coatings.* 7, 96 (2017).
 55. Abdul Khalil, H.P.S., Saurabh, C.K., Adnan, A.S., Nurul Fazita, M.R., Syakir, M.I., Davoudpour, Y., Rafatullah, M., Abdullah, C.K., Haafiz, M.K.M., Dungani, R.: A review on chitosan-cellulose blends and nanocellulose reinforced chitosan biocomposites: Properties and their applications, (2016).
 56. Wang, J., Wang, L., Yu, H., Zain-ul-Abdin, Chen, Y., Chen, Q., Zhou, W., Zhang, H., Chen, X.: Recent progress on synthesis, property and application of modified chitosan: An overview. *Int. J. Biol. Macromol.* 88, 333–344 (2016).
 57. Rinaudo, M.: Chitin and chitosan: Properties and applications. *Prog. Polym. Sci.* 31, 603–632 (2006).
 58. Pillai, C.K.S., Paul, W., Sharma, C.P.: Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. *Prog. Polym. Sci.* 34, 641–678 (2009).
 59. Renault, F., Sancey, B., Badot, P.-M., Crini, G.: Chitosan for coagulation/flocculation processes – An eco-friendly approach. *Eur. Polym. J.* 45, 1337–1348 (2009).
 60. Dutta, P.K., Dutta, J., Tripathi, V.S.: Chitin and Chitosan: Chemistry, properties and applications. *J. Sci. Ind. Res. (India).* 63, 20–31 (2004).
 61. Yamato, H., Ohwa, M., Wernet, W.: Stability of polypyrrole and poly(3,4-ethylenedioxythiophene) for biosensor application. *J. Electroanal. Chem.* 397, 163–170 (1995).
 62. Zainal, M.F., Mohd, Y.: Characterization of PEDOT Films for Electrochromic Applications. *Polym. Plast. Technol. Eng.* 54, 276–281 (2015).
 63. Jiang, C., Chen, G., Wang, X.: High-conversion synthesis of poly(3,4-ethylenedioxythiophene) by chemical oxidative polymerization. *Synth. Met.* 162, 1968–1971 (2012).
 64. Laforgue, A., Robitaille, L.: Production of conductive PEDOT nanofibers by the combination of electrospinning and vapor-phase polymerization, http://www.scopus.com/scopus/openurl/link.url?ctx_ver=Z39.88-

2004&ctx_enc=info:ofi/enc:UTF-8&svc_val_fmt=info:ofi/fmt:kev:mtx:sch_svc&svc.citedby=yes&rft_id=info:eid/2-s2.0-77951888059&rft_id=http://search.ebscohost.com&rft_dat=partnerID:Nn vIuKwx&rft_dat=, (2010).

65. Lawal, A.T., Wallace, G.G.: Vapour phase polymerisation of conducting and non-conducting polymers: A review. *Talanta*. 119, 133–143 (2014).
66. Winther-Jensen, B., West, K.: Vapor-phase polymerization of 3,4-ethylenedioxythiophene: A route to highly conducting polymer surface layers. *Macromolecules*. 37, 4538–4543 (2004).
67. Ghasemi-Mobarakeh, L., Prabhakaran, M.P., Morshed, M., Nasr-Esfahani, M.H., Baharvand, H., Kiani, S., Al-Deyab, S.S., Ramakrishna, S.: Application of conductive polymers, scaffolds and electrical stimulation for nerve tissue engineering, <http://doi.wiley.com/10.1002/term.383>, (2011).
68. Han, S., Feng, Y., Chen, G., Wang, J.: Facile preparation of composites composed of high performance thermoplastic and difficult-to-process functional polymer. *RSC Adv*. 4, 31874 (2014).
69. Repanas, A., Andriopoulou, S., Glasmacher, B.: The significance of electrospinning as a method to create fibrous scaffolds for biomedical engineering and drug delivery applications. *J. Drug Deliv. Sci. Technol*. 31, 137–146 (2016).
70. Dhandayuthapani, B., Yoshida, Y., Maekawa, T., Kumar, D.S.: Polymeric scaffolds in tissue engineering application: A review, <http://www.hindawi.com/journals/ijps/2011/290602/>, (2011).
71. Kim, Y.-T., Haftel, V.K., Kumar, S., Bellamkonda, R. V: The role of aligned polymer fiber-based constructs in the bridging long peripheral nerve gaps.
72. Henriques, C., Vidinha, R., Botequim, D., Borges, J.P., Silva, J.A.M.C.: A systematic study of solution and processing parameters on nanofiber morphology using a new electrospinning apparatus. *J. Nanosci. Nanotechnol*. 9, 3535–3545 (2009).
73. Fong, H., Chun, I., Reneker, D.H.: Beaded nanofibers formed during electrospinning. *Polymer (Guildf)*. 40, 4585–4592 (1999).
74. Son, W.K., Youk, J.H., Lee, T.S., Park, W.H.: The effects of solution properties and polyelectrolyte on electrospinning of ultrafine poly(ethylene oxide) fibers. *Polymer (Guildf)*. 45, 2959–2966 (2004).
75. Pakravan, M., Heuzey, M.C., Aji, A.: A fundamental study of chitosan/PEO electrospinning. *Polymer (Guildf)*. 52, 4813–4824 (2011).
76. Zhang, C., Yuan, X., Wu, L., Han, Y., Sheng, J.: Study on morphology of electrospun poly(vinyl alcohol) mats. *Eur. Polym. J*. 41, 423–432 (2005).
77. Yuan, X.Y., Zhang, Y.Y., Dong, C., Sheng, J.: Morphology of ultrafine polysulfone fibers prepared by electrospinning. *Polym. Int*. 53, 1704–1710 (2004).

78. Mit-uppatham, C., Nithitanakul, M., Supaphol, P.: Ultrathin electrospun polyamide-6 fibers: Effect of solution conditions on morphology and average fiber diameter. *Macromol. Chem. Phys.* 205, 2327–2338 (2004).
79. Li, Z., Wang, C.: *Effects of Working Parameters on Electrospinning*. Springer Berlin Heidelberg (2013).
80. Fradinho, A.C.M.: *Desenvolvimento de uma Conduta Porosa Compreendendo Fibras de Quitosano Destinada à Regeneração Guiada da Espinal Medula*. (2015).
81. Khor, E., Whey, J.L.H.: Interaction of chitosan with polypyrrole in the formation of hybrid biomaterials. *Carbohydr. Polym.* 26, 183–187 (1995).
82. Corradi, R., Armes, S.P.: Chemical synthesis of poly(3,4-ethylenedioxythiophene). *Synth. Met.* 84, 453–454 (1997).
83. Sigma-Aldrich: Cell Types & Culture Characteristics. In: *Fundamental Techniques in Cell Culture Laboratory Handbook – 3rd Edition* | Sigma-Aldrich. p. 13.
84. Kiristi, M., Oksuz, A.U., Oksuz, L., Ulusoy, S.: Electrospun chitosan/PEDOT nanofibers. *Mater. Sci. Eng. C* 33, 3845 (2013).
85. Wang, J., Cai, K., Shen, S.: A facile chemical reduction approach for effectively tuning thermoelectric properties of PEDOT films. *Org. Electron. physics, Mater. Appl.* 17, 151–158 (2015).
86. Gomes, S., Rodrigues, G., Martins, G., Henriques, C., Silva, J.C.: Evaluation of nanofibrous scaffolds obtained from blends of chitosan, gelatin and polycaprolactone for skin tissue engineering. *Int. J. Biol. Macromol.* 102, 1174–1185 (2017).
87. Silva, S.M.L., Braga, C.R.C., Fook, M.V.L., Raposo, C.M.O., Carvalho, L.H., Canedo, E.L.: Application of Infrared Spectroscopy to Analysis of Chitosan/Clay Nanocomposites. *Infrared Spectrosc. - Mater. Sci. Eng. Technol.* 43–62 (2012).
88. Ghosh, S., Remita, H., Ramos, L., Dazzi, A., Deniset-Besseau, A., Beaunier, P., Goubard, F., Aubert, P.-H., Brisset, F., Remita, S.: PEDOT nanostructures synthesized in hexagonal mesophases. *New J. Chem.* 38, 1106 (2014).
89. Invitrogen: PrestoBlue™ reagent Product Overview. *Tech. Inf.* 1–13 (2012).
90. Paradee, N., Sirivat, A.: Synthesis of poly(3,4-ethylenedioxythiophene) nanoparticles via chemical oxidation polymerization. *Polym. Int.* 63, 106–113 (2014).
91. Yi, Y., Zhang, H., Feng, D., Wang, Y., Qin, S.: Hypoglycemic properties of oxovanadium (IV) coordination compounds with carboxymethyl-carrageenan and carboxymethyl-chitosan in alloxan-induced diabetic mice. *Evidence-based Complement. Altern. Med.* 2011, (2011).
92. Duan, B., Dong, C., Yuan, X., Yao, K.: Electrospinning of chitosan solutions in acetic acid with poly(ethylene oxide). *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 15, 797–811 (2004).

Apêndice

Apêndice A - Esterilização das amostras

1. Imergir em 2 ml de etanol 70% (v/v) durante cerca de 15 minutos na concentração de 20 mg/ml;
2. Retirar o excesso de etanol com uma pipeta de Pasteur e deixar as amostras a secar ao ar, dentro da câmara de segurança microbiológica;
3. Irradiar com lâmpada UV da câmara de segurança microbiológica durante 30 minutos.

Apêndice B – Protocolo de tripsinização

1. Aspirar o meio de cultura do T25, tendo em atenção não tocar com a ponta da pipeta na camada com células;
2. Lavar a camada de células com 5 ml de PBS⁻, virando o T25 de forma a ejetar o PBS na camada sem células;
3. Aplicar 500 µL de tripsina (TrypLE) e verificar se o volume se espalha por toda a camada de células, oscilando o T25;
4. Colocar o T25 na incubadora (37°C e 5% CO₂) durante aproximadamente 5 minutos;
5. No microscópio invertido, verificar se as células estão em suspensão e não aglomeradas. Caso não estejam, deve-se bater ligeiramente na parede lateral do frasco de forma a auxiliar mecanicamente o processo;
6. Adicionar 5 ml de meio de cultura;
7. Suspender cerca de 20x e transferir para um *falcon*, identificando a suspensão de células;

Apêndice C – Contagem de células

1. Preparar o hemocitómetro (Hirschmann);
2. Pipetar 100 µl da suspensão de células acabada de suspender para um microtubo;
3. Adicionar 100 µl de azul tripano e voltar a suspender;
4. Preencher as duas câmaras do hemocitómetro com suspensão celular;
5. Observar no microscópio invertido com contraste de fase a grelha do hemocitómetro e proceder à contagem de células viáveis;

6. Calcular a concentração celular (células/ml) através da equação seguinte:

$$C = \frac{\text{total de células viáveis contadas}}{\text{nº de quadrados contados}} \times 2 \times 10\,000$$

O objetivo será colocar cerca de 12 000 células por poço, o que para 96 poços dará um total de 1152 000 células. Sabendo a concentração calculada acima (células/ ml) é possível calcular o volume a retirar da suspensão de células e o volume restante a adicionar de meio.